

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de la signalisation d'Akt en réponse à la désorganisation des lipid rafts dans les kératinocytes épidermiques humains

Clouet, Sophie

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de la signalisation d'Akt en réponse à la désorganisation des *lipid rafts*
dans les kératinocytes épidermiques humains**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Sophie CLOUET

Janvier 2010

Etude de la signalisation d'Akt en réponse à la désorganisation des *lipid rafts* dans les kératinocytes épidermiques humains

CLOUET Sophie

Résumé

Après avoir constaté la phosphorylation du récepteur de l'EGF accompagnée de la déphosphorylation d'Akt suite à la déplétion du cholestérol membranaire induite par la M β CD lors de précédentes études, nous avons cherché à comprendre de quelle façon ce phénomène pouvait conduire à l'inhibition d'Akt. Nous avons d'abord étudié la désorganisation des *lipid rafts*, et pu constater que les *lipid rafts* sont modifiés après 1h de traitement avec la M β CD, suggérant une modification de structure de la membrane. La récupération des kératinocytes ayant déjà été décrite, nous avons analysé l'implication du cholestérol néosynthétisé dans cette récupération en inhibant sa voie de synthèse. En dosant le cholestérol total, nous avons constaté que les modifications engendrées par l'utilisation de la M β CD perdurent en présence de la lovastatine, suggérant un rôle crucial de l'intégrité des *lipid rafts* dans l'homéostasie des kératinocytes. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à Akt et aux origines de sa déphosphorylation. L'inhibition de PTEN ne permet pas de conserver les phosphorylations d'Akt après l'utilisation de la M β CD. Mais, l'inhibition de la PI3K a montré la concordance entre les effets de cette inhibition et ceux de la M β CD sur Akt. Cependant, il semblerait qu'il n'y ait pas d'interaction entre la sous-unité p85 de la PI3K et l'EGFR, et le marquage de p85 ne montre pas de localisation en membrane, ce qui est surprenant au vu des connaissances actuelles sur la PI3K. Ensuite, nous avons étudié la localisation d'Akt et remarqué que les formes activées étaient principalement présentes dans le noyau après le traitement avec la M β CD, montrant que celle-ci a un effet sur l'activation de la protéine. Par une approche utilisant des gradients de densité, nous avons remarqué que l'EGFR et Akt migraient de la même façon dans ces gradients, dans les conditions contrôles comme traitées avec la M β CD. Leur migration correspond avec celle des marqueurs des *lipid rafts*, laissant supposer qu'Akt pourrait être localisée dans ces microdomaines, d'autant plus que l'EGFR est présent dans les *lipid rafts*. Enfin, nous avons analysé si la déphosphorylation d'Akt menait à l'apoptose dans ces conditions : l'activité de la caspase-3 ne semble pas augmenter après 1h de M β CD, indiquant qu'aucune voie apoptotique aboutissant à la caspase-3 ne semble être activée dans ces conditions. En conclusion, nous avons analysé l'implication d'Akt dans les conséquences d'une déplétion en cholestérol induite par la M β CD. La déphosphorylation d'Akt n'est pas due à une suractivation de PTEN mais pourrait dépendre d'une inactivation de la PI3K, et n'induit pas la mort cellulaire dans les kératinocytes.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

Tout d'abord, merci au Professeur Yves Poumay pour m'avoir fait une petite place au sein de son équipe, de m'avoir proposé ce sujet, et pour tout le temps passé à discuter de mes résultats ou à corriger mes écrits afin de mener à bien les deux parties de ce mémoire.

Un grand merci à Sylviane pour sa patience, ses conseils, ses « trucs et astuces », ses réponses à mes questions plus "bêtes" que les siennes, et son suivi à distance malgré son abandon en cette seconde partie du mémoire.

Merci aussi à Françoise et Valérie pour l'initiation à la culture cellulaire, pour les nombreuses mains qu'elles m'ont généreusement prêtées, pour leurs nombreux conseils et leur gentillesse au quotidien.

Merci à Ganka, Conny, Séverine et Aurélie, pour leurs conseils de la « vie de tous les jours » (où je peux trouver... ?), pour les discussions au détour d'un couloir ou de nos écrans d'ordinateur.

Merci à Fred pour ses « Sophie !! » de milieu de matinée, me rapprochant chaque jour un peu plus de la crise cardiaque et qui ne me manqueront sûrement pas, et pour ses questions que lui seul trouve, mais qui sont toujours intéressantes à exploiter.

Merci à Patrick pour ses sauvetages d'ordinateur, et le nettoyage de clé USB à mon arrivée au laboratoire (non, je ne suis pas une terroriste, c'est promis).

Merci à Daniel pour toutes ses anecdotes, sa disponibilité et sa gentillesse monumentale.

Merci à tous les autres membres du laboratoire : Michel Hérin, Annie Degen, Michèle Leclercq-Smekens et Caroline Canon pour leur accueil et leur amabilité.

Merci à Jérémy, même si on n'a fait que de se croiser au sein de ce laboratoire, pour ses conseils d'« ancien » du master, et son soutien.

Merci à Noëlle Ninanne pour les heures passées derrière le microscope confocal, juste pour nous convaincre que notre marquage n'était pas si moche.

Merci au Docteur Isabelle Hamer pour ses conseils sur les micro-centrifugations (entre autres !).

Merci à Marie et Edgar pour le matériel prêté et leur gentillesse.

Merci aux « copines d'en face » (URBC), un coucou à travers la fenêtre permet de se rappeler qu'on est plusieurs dans ce cas !

Merci à tous ceux que j'aurai oublié et qui auraient aimé voir leur nom apparaître dans cette liste (et désolée pour l'oubli, petite tête oblige).

Et *last but not least*, un grand merci à David qui me supporte depuis déjà deux ans bien tassés, mais qui sait passer outre mes jours de mauvaise humeur, et pour son soutien dans les moments les moins drôles, comme on en a tous parfois...

Cette liste est non exhaustive.

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
<i>I. <u>La peau</u></i>	1
1. <u>L'hypoderme</u>	1
2. <u>Le derme</u>	1
3. <u>L'épiderme</u>	1
<i>II. <u>Les kératinocytes</u></i>	2
<i>III. <u>Les voies de signalisation</u></i>	3
1. <u>Les récepteurs</u>	3
2. <u>La PI3K</u>	3
i. <u>Structure</u>	3
ii. <u>Activation</u>	4
<i>IV. <u>Akt</u></i>	4
1. <u>Description</u>	4
2. <u>Régulation</u>	5
3. <u>Activité</u>	6
<i>V. <u>L'apoptose</u></i>	6
<i>VI. <u>La membrane plasmique : rôle du cholestérol</u></i>	7
<i>VII. <u>La désorganisation des lipid rafts dans les kératinocytes</u></i>	8
<i>VIII. <u>Objectif du travail</u></i>	10
 <i>Matériel et méthodes</i>	11
<i>I. <u>Culture cellulaire</u></i>	11
1. <u>Culture primaire de kératinocytes humains</u>	11
2. <u>Culture secondaire</u>	11
3. <u>Culture tertiaire</u>	12
<i>II. <u>Traitements cellulaires</u></i>	12
1. <u>Désorganisation des lipid rafts</u>	12
2. <u>Inhibition de la synthèse de cholestérol</u>	12
3. <u>Inhibition de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)</u>	12
<i>III. <u>Western blot</u></i>	13
1. <u>Principe</u>	13
2. <u>Lyse cellulaire</u>	13
3. <u>Electrophorèse</u>	13
4. <u>Transfert</u>	13

5.	<u>Détection des protéines d'intérêt</u>	14
IV.	<u>Marquage en immunofluorescence</u>	14
1.	<u>Marquage des protéines</u>	14
2.	<u>Marquage des lipids rafts</u>	14
V.	<u>Extraction et dosage du cholestérol</u>	15
1.	<u>Extraction du cholestérol</u>	15
2.	<u>Dosage des protéines</u>	15
i.	Principe	15
ii.	Méthode.....	15
3.	<u>Dosage du cholestérol</u>	16
i.	Principe	16
ii.	Méthode.....	16
VI.	<u>Dosage de l'activité caspase-3</u>	16
1.	<u>Principe</u>	16
2.	<u>Lyse cellulaire</u>	16
3.	<u>Dosage des protéines</u>	17
4.	<u>Dosage de la fluorescence (en triplicat)</u>	17
VII.	<u>Centrifugation en gradients de densité</u>	17
1.	<u>Lyse cellulaire et formation des gradients</u>	17
2.	<u>Précipitation au TCA</u>	17
VIII.	<u>Immunoprécipitation</u>	18
1.	<u>Principe</u>	18
2.	<u>Méthode</u>	18
IX.	<u>Fractionnement cellulaire</u>	18
1.	<u>Principe</u>	18
2.	<u>Méthode</u>	18
i.	Fraction des lipid rafts	19
ii.	Fraction cytosolique	19
iii.	Fraction membranaire	19
3.	<u>Concentration de protéines</u>	20
	Résultats	21
I.	<u>Modèle d'analyse</u>	21
1.	<u>Etude des réponses cellulaires en fonction de l'état de confluence</u>	21
2.	<u>Déplétion du cholestérol</u>	21
3.	<u>Désorganisation des lipid rafts</u>	22
II.	<u>Cause(s) de la récupération</u>	22

III. <u>Déphosphorylation d'Akt</u>	23
IV. <u>Rôle de la PI3K</u>	25
1. <u>Inhibition de la PI3K</u>	25
i. Wortmannine	25
ii. LY294002	25
2. <u>Colocalisation PI3K-EGFR</u>	26
V. <u>Localisation des protéines d'intérêt</u>	27
1. <u>Localisation visuelle</u>	27
i. p85	27
ii. Akt	27
2. <u>Analyse des lipid rafts</u>	28
3. <u>Analyse des différents compartiments cellulaires</u>	29
VI. <u>Recherche d'activité apoptotique</u>	29
Discussion et perspectives	31
I. <u>Mort cellulaire</u>	31
1. <u>L'apoptose</u>	31
2. <u>L'autophagie</u>	31
II. <u>Récupération</u>	32
III. <u>Mécanismes de la M^{CD}</u>	32
1. <u>La PI3K</u>	32
2. <u>PTEN</u>	33
3. <u>PDK1</u>	34
4. <u>Akt</u>	34
IV. <u>Les lipid rafts</u>	34
V. <u>Conclusions et perspectives</u>	35
Bibliographie	36
Annexes	Erreur ! Signet non défini.

INTRODUCTION

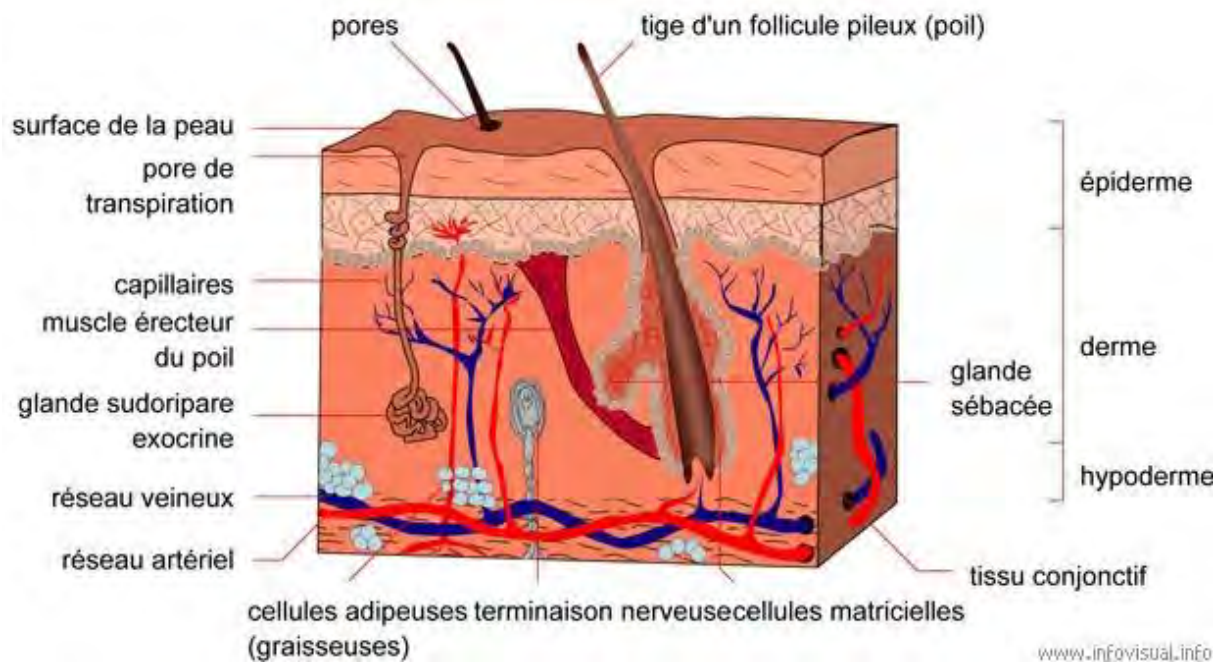


Figure 1 : Coupe schématisée de la peau, montrant l'épiderme, le derme et l'hypoderme.
http://www.afrh.fr/la_maladie_de_verneuil_ou_h/structure_de_la_peau.html

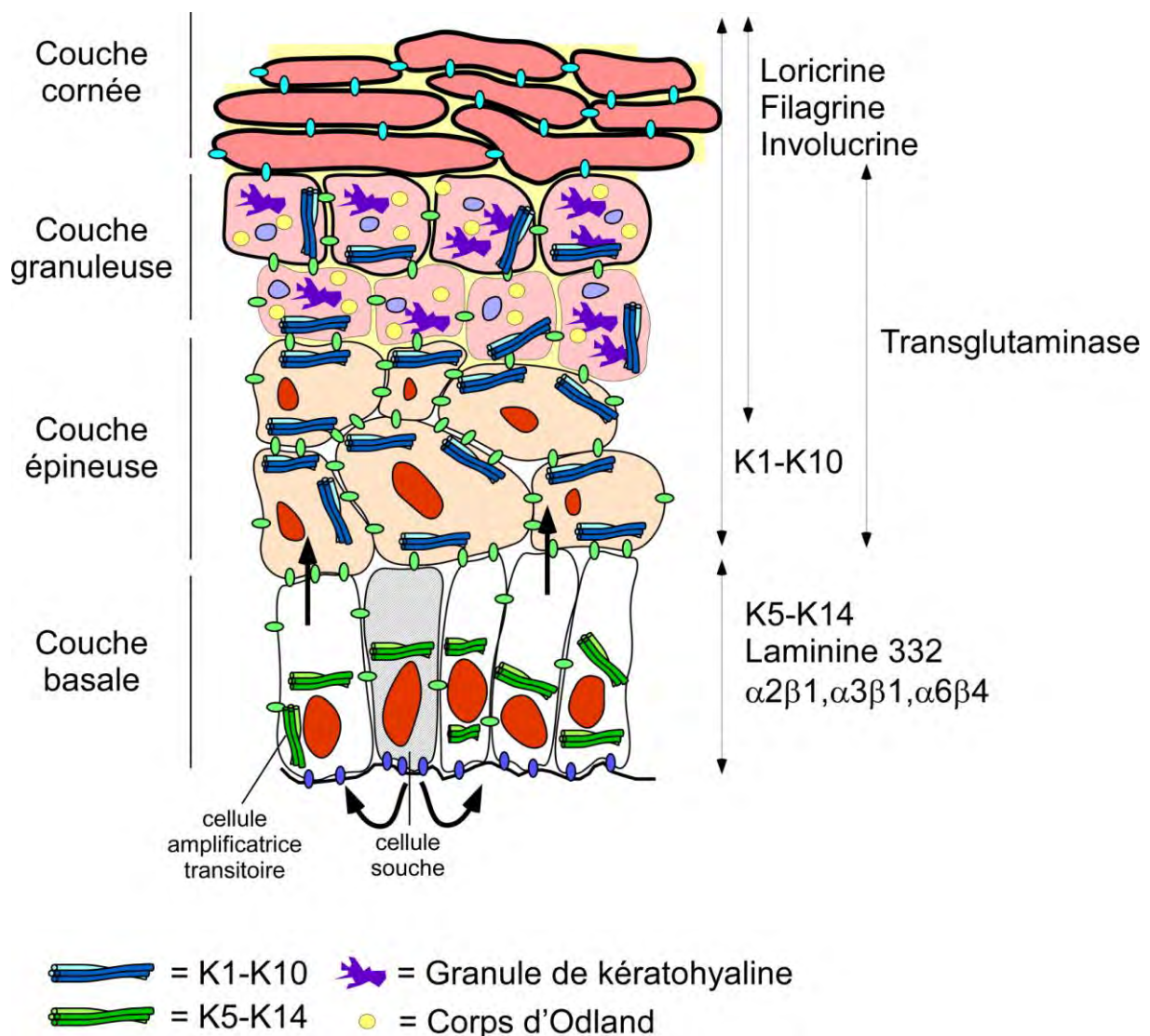


Figure 2 : Schématisation des différentes couches de l'épiderme et de la différenciation des kératinocytes.
 Thèse de Sylviane Lambert (2009)

Introduction

I. La peau

La peau est un organe complexe, le plus externe et le plus grand de l'organisme. Elle pèse en moyenne deux kilogrammes chez un adulte, pour une superficie d'environ 2 m². La peau a pour rôle de le protéger d'agressions extérieures pouvant être provoquées par des agents bactériologiques, physiques ou chimiques, par exemple. Elle régule également la température, et lutte contre la perte de liquides corporels. Elle est formée de trois épaisseurs, décrites ci-après, de l'intérieur vers l'extérieur (Figure 1).

1. L'hypoderme

L'hypoderme est le tissu le plus profond de la peau. Riche en adipocytes (dérivés du mésenchyme), il joue un rôle important comme réserve d'énergie, dans la thermorégulation de l'organisme et dans la mobilité de la peau via les fibres de collagène et d'élastine qui le rattachent au derme (Haake *et al*, 2001).

2. Le derme

Le derme joue un rôle dans la mobilité et l'élasticité de la peau, ainsi qu'un rôle de maintien. Il contient les glandes sébacées, qui sont rattachées aux follicules pileux, et permettent la lubrification des poils, les glandes sudoripares responsables de la sudation qui permet le maintien de la température corporelle et des récepteurs sensoriels. C'est aussi dans ce tissu que sont implantés les follicules pileux. Il est composé de matrice extracellulaire fibreuse et amorphe, constituée de plus de vingt types de collagènes différents (principalement de type I chez l'adulte). Quelques types cellulaires sont présents dans le derme, comme les fibroblastes, responsables de la synthèse des protéines et autres molécules matricielles comme le collagène et la fibronectine, ainsi que de leur dégradation par sécrétion des métalloprotéases (MMP), et des cellules immunitaires comme des macrophages et des cellules dendritiques (Haake *et al*, 2001).

3. L'épiderme

L'épiderme est le tissu exposé à l'environnement extérieur, il confère l'imperméabilité de la peau. L'épiderme comprend quatre types de cellules, dont des mélanocytes qui participent à la photoprotection de la peau, des cellules dendritiques ou cellules de Langerhans qui font partie du système immunitaire, des cellules de Merkel assurant la sensibilité tactile et, les plus abondants, les kératinocytes (Haake *et al*, 2001). L'épiderme est composé de quatre couches (Figure 2) :

- La couche basale, couche la plus profonde de l'épiderme, abrite les cellules souches et les « *transit amplifying cells* » qui assurent le renouvellement cellulaire puisque la prolifération n'a lieu que dans cette couche. Ces kératinocytes peuvent aussi migrer vers la surface, amenant à l'élaboration

des diverses couches épidermiques contenant des kératinocytes à des stades de différenciation distincts. Dans la couche basale, les kératinocytes sont cylindriques et possèdent des filaments intermédiaires de kératines 5 et 14.

- La couche épineuse, où les kératinocytes s'élargissent et possèdent des filaments intermédiaires de kératines 1 et 10, composés de faisceaux denses. Cette couche doit son nom aux nombreux desmosomes éparpillés autour des cellules, jouant donc un rôle dans l'adhérence intercellulaire.
- La couche granuleuse doit son nom aux granules de kératohyaline, (contenant la profilaggrine). Il faut y noter aussi la présence de loritrine, d'involucrine et de transglutaminase capable de conjuguer les deux dernières protéines pour former l'enveloppe cornée. Les kératinocytes y sont devenus aplatis et contiennent toujours les kératines 1 et 10, mais leur noyau devient pycnotique.
- La couche cornée, dont les cellules mortes ne possèdent plus de noyau, sont composées des kératines conjuguées, et sont entourées de l'enveloppe cornée. Elles sont appelées cornéocytes.

Le processus de différenciation est bien défini et produit ces diverses couches. Il est responsable de la migration des kératinocytes et de la formation de la structure de l'épiderme en quatre couches définies, basées sur les observations des cellules.

II. Les kératinocytes

Les kératinocytes sont les principales cellules de l'épiderme (Kwang, 1999). En se différenciant, ils vont également migrer et former les couches de l'épiderme, jusqu'à la couche cornée où ils deviennent des cornéocytes, stade terminal de la différenciation, considérés comme morts. Néanmoins, cette différenciation terminale n'est pas strictement de l'apoptose (mort cellulaire programmée) décrite dans d'autres tissus, puisque le processus de différenciation chez les kératinocytes requiert plus de temps que l'apoptose, que la membrane plasmique n'est pas détruite et que le phénomène touche tous les kératinocytes se situant dans les couches supra-basales de l'épiderme, et non pas une cellule unique au sein du tissu (Gandarillas *et al*, 1999). De plus, la formation de la couche cornée implique une réorganisation du cytosquelette, l'assemblage de l'enveloppe cornée formée principalement de loritrine et d'involucrine, et la dégradation du noyau (Rendl *et al*, 2002). Les mécanismes moléculaires de la lyse du noyau sont encore peu connus. Aussi, les auteurs ont remarqué l'activation de la caspase-14 lors de la formation de la couche cornée dans des kératinocytes en culture, caspase qui n'est, par ailleurs, pas activée lors de l'apoptose classique.

La signalisation au sein des kératinocytes est importante afin de maintenir l'homéostasie de l'épiderme par le contrôle de la prolifération, et de la différenciation/migration, en fonction des besoins de l'épiderme. Une signalisation peut être induite via les protéines d'adhésion, les ions calcium, et les récepteurs membranaires (Pece *et al*, 1999 ; Haake *et al*, 2001). Ainsi, des signaux extracellulaires peuvent transmettre les informations nécessaires aux kératinocytes via les facteurs de croissance qui vont activer des récepteurs dont la cascade de signalisation va induire des réponses physiologiques.

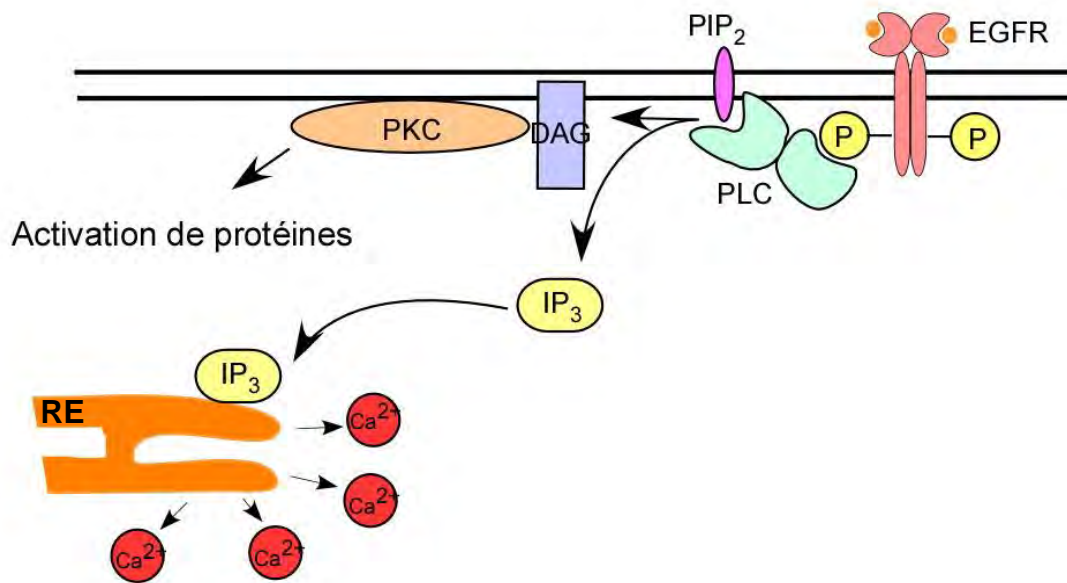


Figure 3 : Activation de la voie des PKC par le récepteur de l'EGF

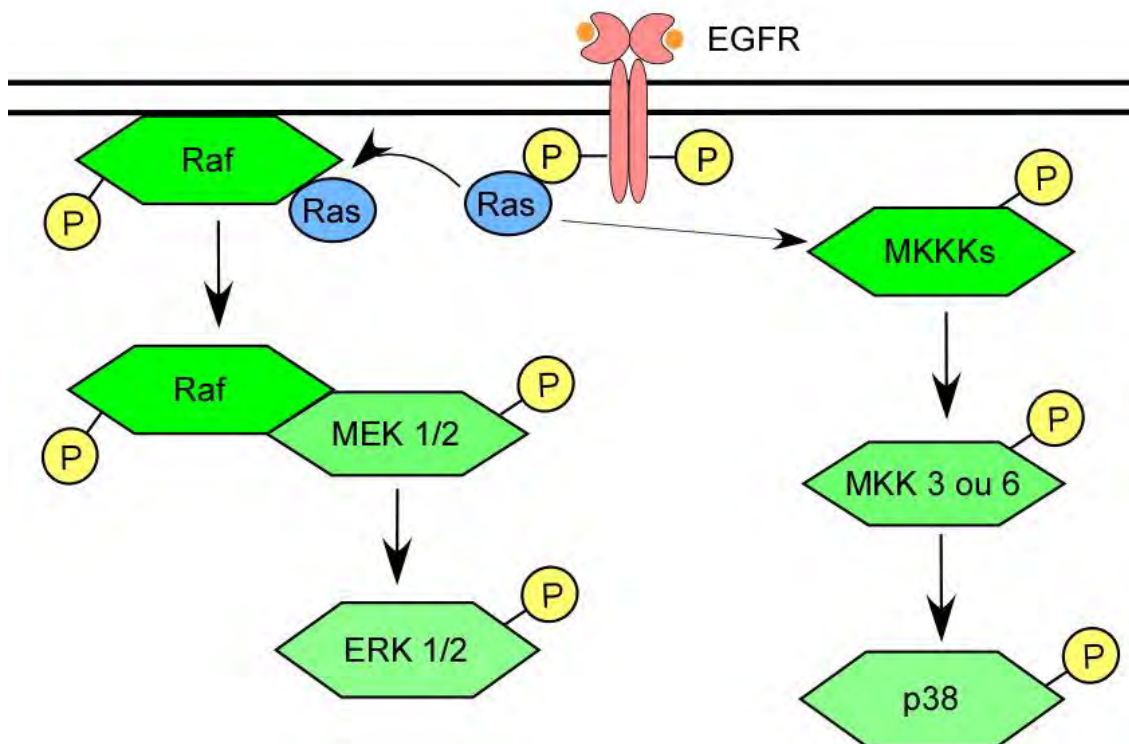


Figure 4 : Activation de la voie des MAPK par le récepteur de l'EGF

III. Les voies de signalisation

1. Les récepteurs

Au sein de la membrane plasmique, on peut trouver plusieurs sortes de récepteurs, dont les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Parmi les RTKs, on trouve le récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGF) dont la liaison avec ses ligands spécifiques entraîne la dimérisation, puis la transphosphorylation du récepteur sur son domaine intracellulaire (Yarden et Schlessinger, 1987). Il faut savoir qu'il existe quatre types de récepteurs à l'EGF : l'EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4, qui peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. Mais, ErbB2 ne possède pas de site de liaison au ligand, et ErbB3 ne possède pas d'activité kinase sur sa partie intracellulaire (Jorissen *et al*, 2003), donc ces deux types d'homodimères seront inactifs. Aussi, ErbB4 n'est pas présent dans les kératinocytes humain normaux (De Potter *et al*, 2001). Les seuls « couples » de récepteurs pouvant donc être actifs dans les kératinocytes seront l'homodimère EGFR/EGFR, et les hétérodimères EGFR/ErbB2, EGFR/ErbB3 et ErbB2/ErbB3.

Le récepteur ainsi activé se trouve dans la possibilité de phosphoryler d'autres protéines intracellulaires qui auront pour rôle de transmettre le signal ou de recruter d'autres activateurs du signal. Par exemple, le récepteur peut activer la phospholipase C (PLC) qui va cliver le phosphatidylinositol-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol tri-phosphate (IP₃). Le DAG permet l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui va mener à l'activation d'autres protéines ; et l'IP₃ va interagir avec le réticulum endoplasmique et entraîner la sortie d'ions calcium dans le milieu cytoplasmique, qui pourront avoir des conséquences diverses (Alberts *et al*, 2008) (Figure 3).

Aussi, le récepteur peut activer la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) par l'intermédiaire de Ras. Les MAPK sont connues pour intervenir au niveau de protéines ou de la transcription de gènes cibles (Alberts *et al*, 2008) (Figure 4).

En troisième lieu, la phosphorylation du récepteur permet l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), qui phosphoryle le PI(4,5)P₂ en phosphatidylinositol-tri-phosphate (PI(3,4,5)P₃) (Duronio, 2008). La présence du PI(3,4,5)P₃, ainsi qu'en partie de celle du PI(3,4)P₂, produit par les phosphatases *Src homology 2-containing inositol phosphatase* (SHIP) -1 ou -2 (Voir annexe 1), est nécessaire au recrutement en membrane de la *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) et d'Akt (ainsi nommée d'après la lignée cellulaire *AKR mouse thymoma*, et aussi appelée protéine kinase B (PKB)). Ce recrutement en membrane mène à la phosphorylation d'Akt qui, une fois activée, quitte la membrane et va pouvoir agir sur des protéines régulant la croissance cellulaire, le cycle cellulaire ou l'apoptose, tant au niveau cytoplasmique que nucléaire (Alberts *et al*, 2008 ; Datta *et al*, 1999 ; Sale et Sale, 2008) (Figure 5).

2. La PI3K

i. Structure

Il existe trois classes de PI3K (I, II et III), déterminées par la structure de leurs sous-unités et leurs substrats lipidiques. La classe I est divisée en deux groupes : les Ia et les Ib. Les

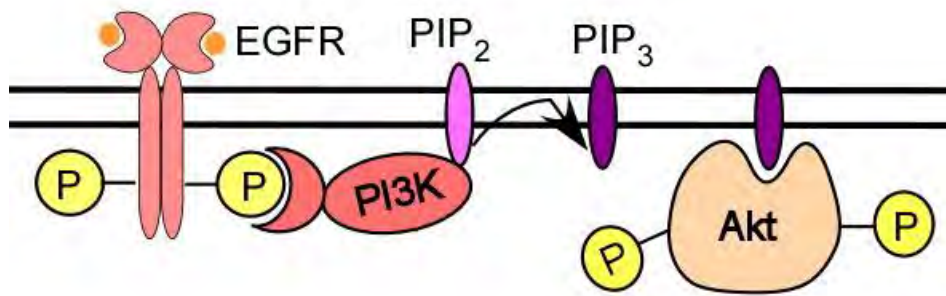


Figure 5 : Activation de la voie de la PI3K par le récepteur de l'EGF

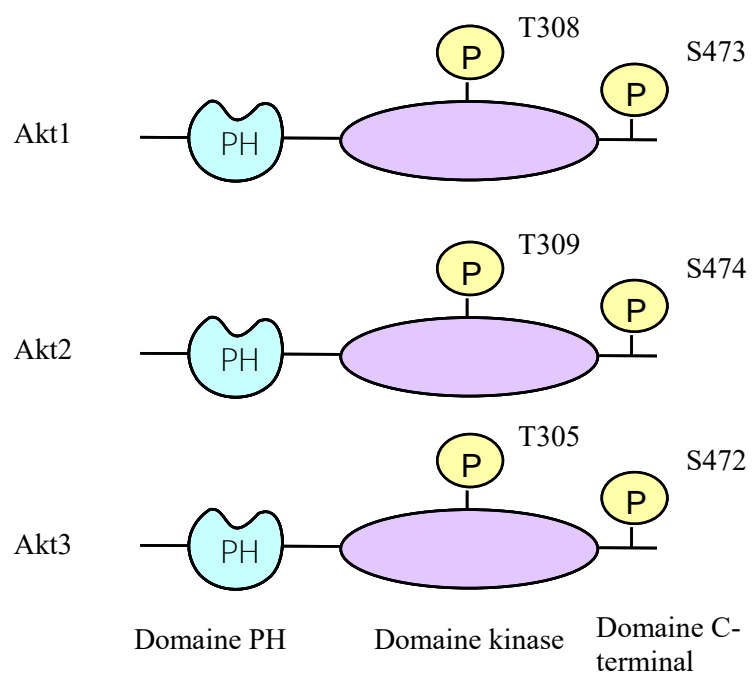


Figure 6 : Isoformes d'Akt

Ia sont composées d'une sous-unité régulatrice $p85\alpha$, ou β et d'une sous-unité catalytique $p110\alpha$, β ou δ , phosphorylent le $PI(4,5)P_2$ en $PI(3,4,5)P_3$ et sont activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Les Ib sont composées d'une sous-unité régulatrice $p101$ et d'une sous-unité catalytique $p110\gamma$ et sont activées par les récepteurs couplés aux protéines G (Djordjevic et Driscoll, 2002). Ici, seule la PI3K Ia sera abordée.

ii. Activation

La PI3K Ia est activée par les RTKs. Dans le cas du récepteur de l'EGF, la PI3K peut être recrutée par les hétérodimères ErbB3/EGFR, ou par les homodimères EGFR/EGFR. La sous-unité $p85$ a une meilleure affinité pour ErbB3 que pour EGFR, et se lie via son domaine SH2 au récepteur. Ainsi, elle se trouve à proximité du domaine kinase d'EGFR et peut être phosphorylée par celui-ci. Pour les homodimères EGFR/EGFR, $p85$ peut se lier à la tyrosine 920 du récepteur, se situant en plein cœur du domaine kinase, tyrosine phosphorylée par une Src kinase qui peut elle-même phosphoryler directement $p85$ (Jorissen et al, 2003).

iii. Inhibiteurs

La PI3K possède plusieurs inhibiteurs, parmi lesquels la wortmannine et le LY294002.

La wortmannine est un stéroïde obtenu chez le *Penicillium wortmanni* qui inhibe de façon irréversible la PI3K par modification covalente d'un résidu lysine situé dans le domaine catalytique de l'enzyme (Wymann et al, 1996).

Le LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4 H-1-benzopyran-4-one) inhibe la PI3K en empêchant la liaison de l'ATP sur le site catalytique de la PI3K, par encombrement stérique.

IV. Akt

1. Description

Akt existe sous 3 isoformes : Akt1 ou PKB α , Akt2 ou PKB β et Akt3 ou PKB γ . La première forme est la plus courante puisqu'on la retrouve de façon ubiquiste dans tout l'organisme. Akt2 est surtout trouvée dans les tissus cibles de l'insuline, et Akt3 est une forme plus rare, principalement présente dans le cerveau et quelques adipocytes (Sale et Sale, 2008). Bien que leur mode d'activation et leurs actions soient sensiblement identiques, leurs sites de phosphorylation sont légèrement décalés d'une isoforme à l'autre (Figure 6).

L'isoforme 1 étant la seule présente dans les kératinocytes, lorsqu'il sera fait mention d'« Akt » par la suite, il s'agira d'Akt1.

Akt possède un domaine *pleckstrin homology* (PH) qui, au repos, cache ses deux sites de phosphorylation. La liaison au $PI(3,4,5)P_3$ permet le dépliement du domaine PH, libérant ainsi les deux sites de phosphorylation. PDK1, étant elle-aussi recrutée en membrane par son domaine PH, est activée grâce à son auto-phosphorylation sur la sérine 241. Cette protéine

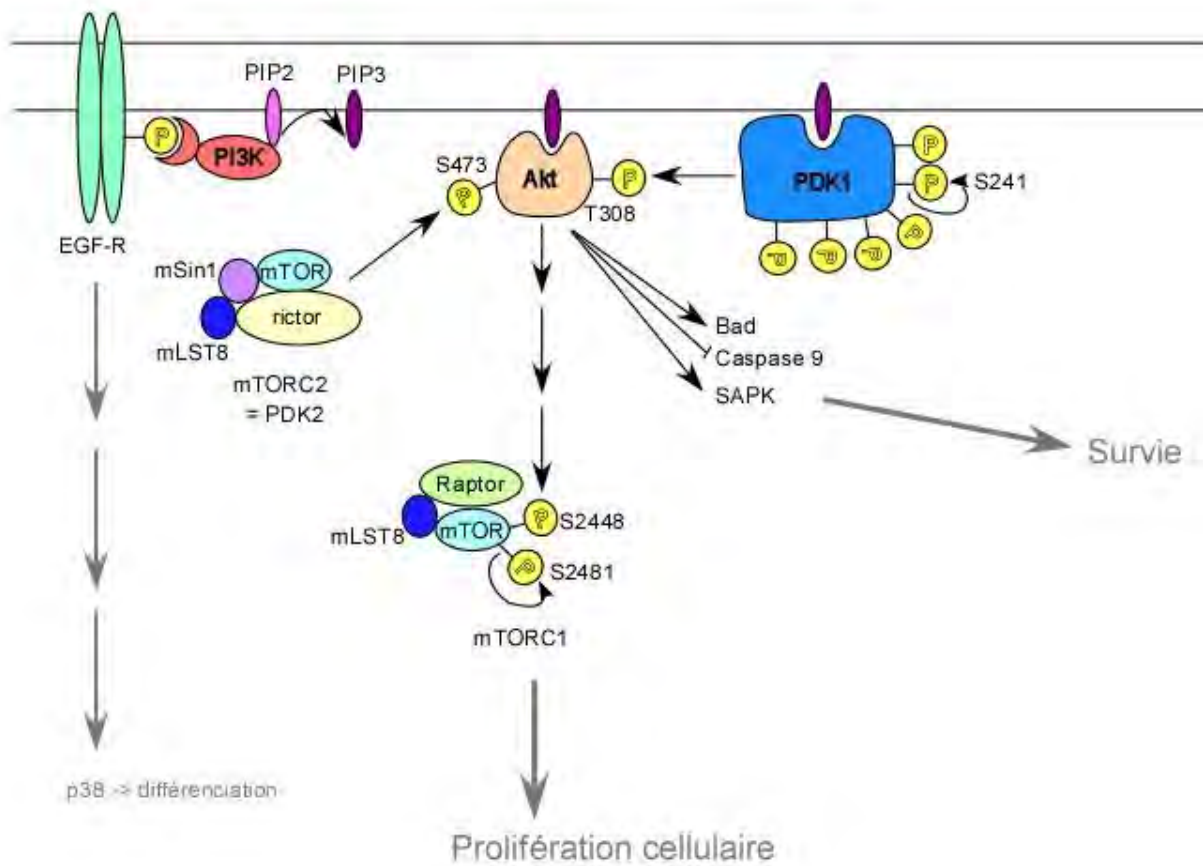


Figure 7 : Schéma général résumant les étapes de la voie PI3K/Akt. Les sites de phosphorylation activateurs sont indiqués.

sera responsable de la phosphorylation de la thréonine 308 d'Akt. L'autre site de phosphorylation (sérine 473) se situe sur le domaine C-terminal, et la phosphorylation va s'effectuer grâce au complexe mTOR 2 (mTORC2). Bien que les deux phosphorylations soient nécessaires pour établir l'activité complète d'Akt, la phosphorylation sur le site de la sérine 473 joue un plus grand rôle dans l'activité d'Akt car elle stabilise la conformation du domaine kinase (Sale et Sale, 2008). Il semblerait que la présence de PI(3,4)P₂ favorise la phosphorylation de ce site *in vitro* et dans les mastocytes (Alessi *et al*, 1997 ; Scheid *et al*, 2002).

mTORC2 est composé de mSin1, mLST8, Rictor (pour *rapamycin-insensitive companion of mTOR*) et *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Il existe peu d'informations à propos de mLST8 et de mSin1. Il semblerait néanmoins que Sin1 soit nécessaire à la stabilité du complexe et que mLST8, chez la souris, serait essentielle pour le bon fonctionnement du complexe. Rictor joue un rôle dans l'activité du complexe et également dans sa stabilité (Yang et Guan, 2007). mTOR possède l'activité sérine-thréonine kinase. Pour être actif, la protéine doit s'auto-phosphoryler sur la sérine 2481.

On retrouve également mTOR dans le complexe mTOR 1 (mTORC1) composé aussi de mLST8 et de Raptor (pour *rapamycin-sensitive adaptor protein of mTOR*). Il a été montré que dans ce complexe, mTOR est phosphorylée sur la sérine 2448, suite à l'activation d'Akt (Figure 7).

2. Régulation

La régulation de l'activité d'Akt peut se faire de façon directe ou indirecte. Akt est directement déphosphorylée par les *PH domain leucine-rich repeat phosphatase* 1 et 2 (PHLPP1 et 2) sur la sérine 473 (Gao *et al*, 2005 ; Brognart *et al*, 2007). Mais ces derniers auteurs ont également montré que PHLPP1 n'interagissait qu'avec Akt2 et 3 et qu'Akt1 et 3 étaient déphosphorylées par PHLPP2. Quand à la thréonine 308, elle est déphosphorylée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Kuo *et al*, 2008).

Quelques protéines également ont la faculté de se lier à Akt, non pas pour être phosphorylées, mais pour diminuer la phosphorylation d'Akt. Par exemple, la *carboxyl-terminal modulator protein* (CTMP) a été trouvée se liant à l'extrémité C-terminale d'Akt. Cette interaction a également lieu en membrane et a pour conséquence de diminuer ainsi la phosphorylation d'Akt sur ses deux sites, mais principalement sur la sérine 473 (Maira *et al*, 2001). TRB3 (ou *neuronal cell death-inducible putative protein kinase* NIPK) peut aussi se lier au domaine kinase d'Akt, cachant ainsi son site de phosphorylation T308 (Du *et al*, 2003).

La régulation indirecte d'Akt est liée à la présence du PI(3,4,5)P₃ en membrane et c'est le plus souvent par l'intermédiaire de la régulation du PI(3,4,5)P₃ qu'est régulée l'activité d'Akt. La quantité de PI(3,4,5)P₃ en membrane peut être diminuée par la *phosphatase and tensin homolog on chromosome ten* (PTEN), qui déphosphoryle le PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂. PTEN étant un oncogène, cette protéine est fortement régulée, au niveau transcriptionnel comme post-traductionnel, par phosphorylation, acétylation, ubiquitinylation et oxydation (Tamguney et Stokoe, 2007). Sa transcription peut aussi être activée grâce à de nombreux facteurs (voir annexe 2). Dans de nombreux cas de cancer, PTEN est mutée et inactivée, supprimant ainsi l'inhibition d'Akt, et favorisant la progression tumorale (Samuels *et al*, 2004).

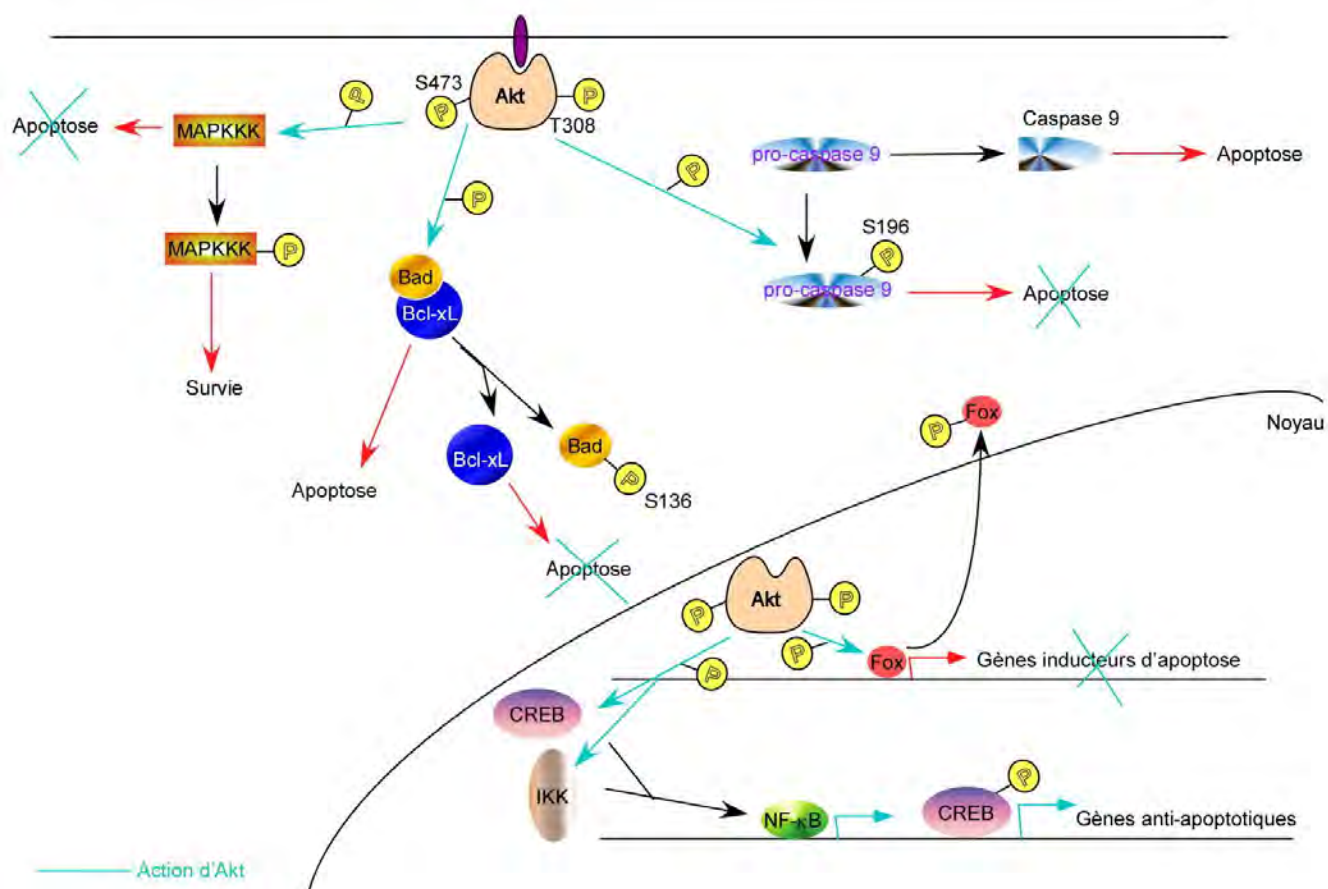


Figure 8 : Représentation des rôles anti-apoptotiques d'Akt. En turquoise sont représentées les conséquences de l'action d'Akt sur certaines protéines, sur le processus d'apoptose ou sur la transcription de gènes.

Egalement, SHIP-1 et -2 déphosphorylent le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ en $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$. Même si la protéine Akt peut se lier au $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, elle le fait avec une meilleure affinité sur le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, diminuant ainsi son recrutement en membrane et son activation, comme montré dans les lymphocytes B (Aman *et al*, 1998). Curieusement, cette inhibition n'a pas été retrouvée dans des cellules de myélome, dans une étude effectuée par Choi *et al* (2002). L'importance de SHIP sur l'activité d'Akt semble donc varier en fonction des types cellulaires. A notre connaissance, aucune étude ne semble avoir été réalisée sur le rôle de SHIP dans les kératinocytes humains.

3. Activité

Akt est un acteur important pour la cellule. Elle est connue pour activer le cycle cellulaire, la croissance cellulaire et inhiber l'apoptose (Kennedy *et al*, 1997 ; Datta *et al*, 1999 ; Sale et Sale, 2008).

Une fois activée, Akt va, via des intermédiaires, provoquer la phosphorylation de mTOR sur la sérine 2448, celui-ci se trouvant dans le complexe mTORC1. La phosphorylation de mTOR permet l'activation du complexe qui aura à son tour plusieurs cibles. Notamment, l'*eukaryotic factor 4E-binding protein* (4E-BP1) qui est lié au facteur d'initiation de la traduction *eucaryotic initiation factor* eIF-4E, sera inhibé. Quand 4E-BP1 est phosphorylé par mTORC1, cela conduit à la libération de eIF-4E, qui se retrouve alors en mesure d'enclencher la traduction et ce mécanisme mène à la prolifération cellulaire (Brunn *et al*, 1997).

Akt inhibe aussi l'apoptose en phosphorylant de nombreuses protéines comme les *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK) (Krishna et Narang, 2008); Bad, libérant ainsi l'anti-apoptotique Bcl-x_L (Del Peso *et al*, 1997 ; Datta *et al*, 1997) ; la pro-caspase 9 (Cardone *et al*, 1998), empêchant son clivage ; et divers facteurs de transcription comme les Fox (Rena *et al*, 1999 ; Biggs *et al*, 1999) qui induisent la transcription de gènes apoptotiques ; IKK, qui phosphoryle l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) et libère ce dernier (Kane *et al*, 1999) ; et enfin le *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB) (Du et Montminy, 1998), dont la phosphorylation le rend apte à induire la transcription de gènes anti-apoptotiques (Figure 8). Tous ces mécanismes contribuent à inhiber l'apoptose, même si Akt n'est pas la seule protéine à jouer un rôle inhibiteur important.

On voit donc qu'Akt joue des rôles primordiaux pour les cellules et a de nombreux substrats, ce qui rend sa régulation très importante. Ainsi, une inhibition d'Akt est donc un mauvais signe pour la cellule puisque sa prolifération pourrait être arrêtée et les voies apoptotiques ne seraient plus inhibées.

V. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée est un processus naturel qui touche toutes les cellules. Elle a un rôle essentiel notamment pendant le développement (Zakeri et Lockshin, 2002 ; Bright et Khar, 1994), ou dans les tissus matures où l'apoptose permet d'éliminer les cellules dégénératives ou tumorales ou les cellules immunitaires qui reconnaissent l'antigène du soi, et pour limiter le nombre de cellules.

Néanmoins, l'apoptose est peu fréquente chez les kératinocytes. Même lorsque, *in vitro*, les cellules sont cultivées en suspension, il n'y a pas d'augmentation de l'activation de l'apoptose avant 24h, les cellules étant donc peu sensibles à l'anoïkis ; ou dans des cultures adhérentes privées de facteurs de croissance, l'apoptose est également rare (Gandarillas et al, 1999). Mais cela ne signifie pas qu'elle soit inexistante : elle est même indispensable pour éviter le développement de maladies telles que le cancer de la peau ou le psoriasis, par exemple (Raj et al, 2006).

Une cellule entrant en apoptose passe par divers stades. Tout d'abord, elle s'isole, perd contact avec les autres cellules et avec la matrice extracellulaire, la chromatine se condense et l'ADN est clivé par une enzyme, la CAD (caspase-activated DNase) qui produit des fragments multiples de 180 pb, détectables par électrophorèse. La phosphatidylsérine (PS) est exposée sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Puis, la cellule se rétracte, toutes les protéines se condensent également. La membrane gonfle et se rompt, donnant naissance aux corps apoptotiques qui seront reconnus grâce à la PS et dégradés par phagocytose sans engendrer de réaction inflammatoire (Bright et Khar, 1994).

Il existe deux voies majoritaires pour déclencher l'apoptose : les récepteurs de mort (voie extrinsèque) et les signaux extracellulaires indépendants de ces récepteurs (voie intrinsèque), qui peuvent être reliées par diverses familles de protéines, dont la famille des protéines Bcl-2. Il a été montré aussi que les calpaïnes et les cathepsines peuvent jouer un rôle pro-apoptotique (Inoue et al, 2004 ; Conus et Simons, 2008).

Néanmoins, la plupart des voies apoptotiques mènent à l'activation des caspases effectrices, dont la caspase-3 qui interviennent suffisamment tardivement pour en faire des marqueurs d'apoptose (voir annexe 3).

Au vu des différents substrats d'Akt cités ci-dessus, il semblerait que cette protéine inhibe préférentiellement les voies apoptotiques intrinsèques, puisqu'elle inhibe la caspase-9 et Bad qui interagit avec la mitochondrie.

VI. La membrane plasmique : rôle du cholestérol

La membrane plasmique délimite la périphérie de la cellule et est le siège d'échanges entre les cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire. Ainsi, la composition de la membrane est nécessaire à la transmission adéquate des signaux. La membrane assure aussi l'étanchéité des cellules, mais permet le passage d'ions ou d'autres molécules afin de conserver les équilibres osmotiques ou ioniques, essentiels au bon développement cellulaire.

Les régions riches en cholestérol et en sphingolipides de la membrane plasmique forment de petites structures fortement dynamiques appelées *lipid rafts* et impliquées dans les régulations cellulaires. Les *lipid rafts* semblent jouer de nombreux rôles dont beaucoup ne sont certainement pas encore connus, mais on sait qu'ils interviennent dans la voie endocytaire, notamment via les cavéoles, considérées comme faisant partie des *lipid rafts* (Simons et Ikonen, 1997). Ces structures sont très instables et évoluent constamment, ce qui les rend encore plus difficiles à étudier. Il semblerait que leur composition soit variable entre les cellules, et sur une même cellule à des moments différents (Golub *et al*, 2004).

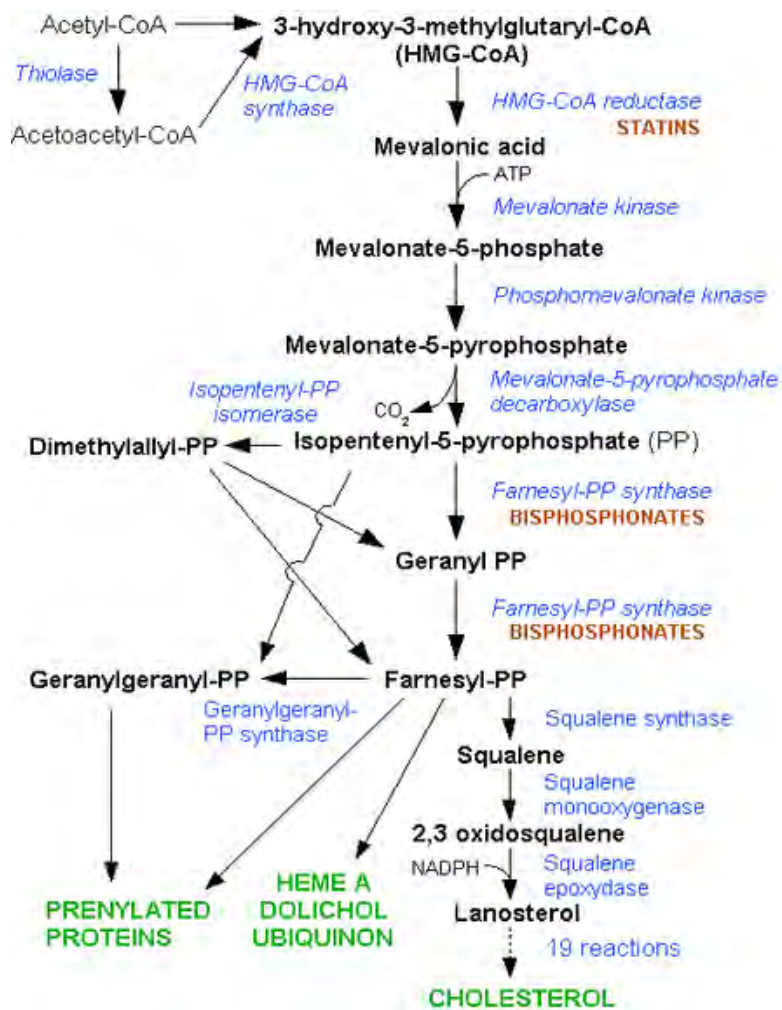


Figure 9 : Voie de synthèse du cholestérol.

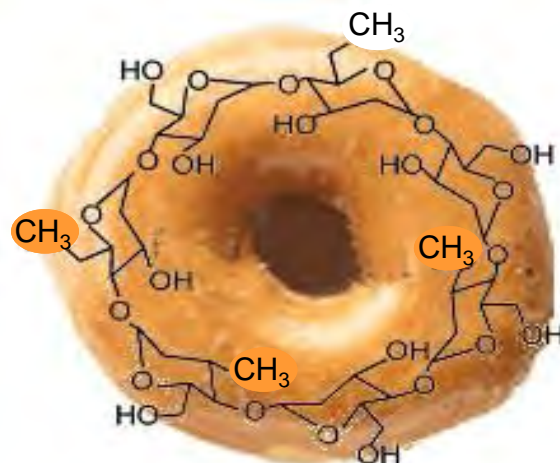


Figure 10 : Représentation de la molécule de MβCD en forme de beignet.

Les *lipid rafts* contiennent également des protéines transmembranaires ou ancrées par un GPI permettant les signalisations intercellulaires (Simons et Ikonen, 1997), parmi lesquelles on retrouve divers récepteurs de facteurs de croissance, dont le récepteur de l'EGF (Pike, 2005). Quant à Akt, sa localisation précise lorsque cette protéine est recrutée en membrane n'est pas encore définie. Certains auteurs la trouvent totalement absente des *lipid rafts* (Jahn *et al*, 2007), d'autres en révèlent tout de même une petite partie recrutée dans les *lipid rafts* suite à la formation de PI(3,4,5)P₃ (Gao *et al*, 2008 ; Calay *et al*, 2010).

Le cholestérol joue un rôle important dans la membrane plasmique des kératinocytes, où il est inséré entre les phospholipides membranaires. Il intervient dans la transmission de signaux et favorise la rigidité membranaire. Il a été montré que la quantité de cholestérol cellulaire augmente avec le stade de différenciation du kératinocyte, et qu'il est nécessaire à la formation de la couche cornée (Schmidt *et al*, 1991).

Le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA, à partir duquel l'hydroxyméthyl-glutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) va pouvoir être formée en deux étapes. Cette voie peut être bloquée à ce niveau par les statines (Figure 9).

VII. La désorganisation des lipid rafts dans les kératinocytes

Ainsi, l'intégrité et la bonne organisation des *lipid rafts* semblent importantes, puisqu'elles sont corrélées à l'activation de plusieurs voies régulatrices essentielles, impliquées notamment dans la croissance cellulaire, la différenciation ou l'apoptose.

Il a été montré que les *lipid rafts* étaient présents dans les kératinocytes HaCaT (Gniadecki *et al*, 2002), et plusieurs études de notre laboratoire et du laboratoire du Dr. Robert Gniadecki à Copenhague ont déjà étudié la désorganisation des *lipid rafts* dans les kératinocytes par l'utilisation de méthyl-bêta-cyclodextrine (M β CD).

La M β CD est une substance fréquemment utilisée pour désorganiser les *lipid rafts*. Cet heptamère de glucose (Figure 10) est circulaire et a la propriété de séquestrer le cholestérol au centre du « beignet », déplaçant donc la membrane plasmique de ce lipide (Klein *et al*, 1995) lorsque cette molécule est ajoutée à des cellules en culture. Elle entraîne une diminution faible mais significative du cholestérol cellulaire total, et par immunofluorescence, on peut voir que le cholestérol est principalement présent en membrane dans les kératinocytes au repos, mais que le cholestérol n'est plus retrouvé que péri-nucléaire après un traitement d'une heure avec 7,5 mM de M β CD (Jans *et al*, 2004). Ce phénomène est considéré comme responsable d'une forme de désorganisation des *lipid rafts*, qui perdent ainsi certaines de leurs propriétés physico-chimiques dues à leur riche concentration en cholestérol. Cette modification entraîne une perturbation dans la transmission des signaux, qui ne s'effectue donc plus normalement.

Ces nombreuses études ont tout d'abord montré que les *lipid rafts* étaient plus enrichis dans les *transit amplifying stem cells* que dans les cellules souches (Gniadecki et Bang, 2003), laissant supposer que les *lipid rafts* pouvaient avoir un rôle dans la régulation du phénotype des kératinocytes. Ceci a été confirmé par Jans *et al* (2004) qui ont montré que lorsqu'ils traitaient les cellules avec de la M β CD et qu'ils les laissaient récupérer pendant 17h avec du milieu normal additionné de lovastatine, ils voyaient une diminution de l'expression des kératines 14 et 10, et une augmentation de l'expression de l'involucrine dans des cellules confluentes, montrant l'évolution vers la différenciation des cellules traitées, et donc que

l'altération du phénotype des kératinocytes était une conséquence de la déplétion du cholestérol. Egalement, ils ont confirmé que traiter les cellules avec de l'EGF conduisait à l'activation du récepteur de l'EGF et à une diminution de l'expression de la kératine 10 (Poumay et Pittelkow, 1995), et ont montré qu'elle aboutissait à une augmentation de celle de l'involucrine.

Dans un second temps, ils ont montré que traiter avec seulement de la M β CD activait le récepteur de l'EGF mais n'avait aucun effet sur la phosphorylation de ERK, ce qui a été réfuté par la suite (Lambert *et al*, 2006 et 2008). Cette étude a fait le rapprochement avec la phosphorylation de p38 constatée après le traitement avec la M β CD et l'augmentation de l'expression de l'involucrine, confirmant l'hypothèse de Efimova *et al* (2003).

Lambert *et al* (2006) ont étudié la régulation de l'activité du récepteur de l'EGF par le cholestérol membranaire sur les kératinocytes HaCaT. Ils ont remarqué que le récepteur de l'EGF dans les cellules au repos était principalement localisé dans les *lipid rafts*, et dans le reste de la membrane mais en plus petite quantité, et après le traitement avec la M β CD, le récepteur était principalement retrouvé dans la membrane apicale des cellules, montrant une modification de la localisation d'EGFR après la déplétion du cholestérol. Puis, ils ont montré que le récepteur de l'EGF était activé après traitement avec la M β CD et que cela activait également ERK1/2. Enfin, afin de comprendre les mécanismes de cette activation, ils ont bloqué le site de liaison au ligand du récepteur, et constaté que le récepteur était tout de même activé après le traitement avec la M β CD, donc ils en ont conclu que l'activation du récepteur suite à la déplétion en cholestérol s'effectuait de façon ligand-indépendante.

Ensuite, le processing et la localisation du récepteur de l'EGF après un traitement avec la M β CD ont été analysés dans des kératinocytes normaux (Lambert *et al*, 2008). L'activation du récepteur de l'EGF, la phosphorylation de p38 et celle de ERK1/2 après traitement avec la M β CD, avec de l'EGF ou de l'H₂O₂ ont été confirmées. Puis, ils ont montré que la dimérisation du récepteur avait lieu après traitement avec l'EGF, plus faiblement après le traitement avec la M β CD et pas du tout en présence d'H₂O₂. Le récepteur étant connu pour être internalisé après son activation, ils ont regardé ce qu'il se passait de ce côté, et ont remarqué que l'internalisation était totale après l'EGF, partielle après l'H₂O₂, et nulle après traitement avec la M β CD. Cependant, après des périodes de récupération comprises entre une heure et dix-sept heures, ils ont pu remarquer que le récepteur était finalement internalisé entre une heure et trois heures de récupération, soit de façon beaucoup plus longue que lorsque le récepteur est activé avec de l'EGF. Cette internalisation serait clathrine-dépendante (non liée aux lysosomes) et le récepteur est dégradé après trois heures par le protéasome, et est retrouvé en membrane sept heures après le traitement avec la M β CD. Ils ont ensuite identifié que c'était la phosphorylation sur la tyrosine 1068 du récepteur qui était responsable de l'internalisation du récepteur, et que suite à l'internalisation, il y avait une diminution simultanée du taux de phosphorylation de p38, diminuant ainsi son activité. Et parallèlement, l'inhibition de p38 empêche l'internalisation du récepteur après un traitement avec la M β CD, mais semble aussi empêcher l'activation du récepteur et de ERK1/2, ce qui leur a permis de conclure que p38, EGFR et ERK1/2 sont reliés dans ces conditions.

Enfin, ils ont remarqué une déphosphorylation d'Akt après le traitement avec la M β CD, désactivant cette protéine importante pour la survie et la prolifération des cellules. Néanmoins, ils ont montré que cette déphosphorylation n'empêchait pas la prolifération

cellulaire, qui reprenait son cours de façon égale au contrôle lorsque les cellules ont pu récupérer dans du milieu normal.

Une dernière étude, centrée sur la cicatrisation de l'épiderme, a montré que l' H_2O_2 aidait à la cicatrisation en provoquant l'expression du *vascular endothelium growth factor* (VEGF) ou en activant directement le récepteur de l'EGF (Mathay *et al*, 2008). Aussi, l'*heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), qui est un facteur de croissance autocrine, peut activer EGFR, ce qui est crucial pour la réparation de l'épiderme, et les cytokines qui induisent ce facteur de croissance sont p38 et ERK1/2 dépendantes. Par ailleurs, ils ont montré qu'HB-EGF était capable d'induire la migration des kératinocytes, et qu'après un traitement avec la M β CD, ils ont observé une rapide augmentation de la phosphorylation de p38, qui induisait la production d'involucrine et de proHB-EGF, celle-ci ayant lieu après quatre à huit heures de récupération dans du milieu normal.

VIII. Objectif du travail

Suite à toutes ces observations, et notamment l'activation du récepteur de l'EGF parallèle à la déphosphorylation d'Akt après le stress infligé aux kératinocytes par la M β CD, nous avons basé ce mémoire sur la compréhension des mécanismes de la déplétion du cholestérol induite par la M β CD sur Akt et les conséquences que la déplétion du cholestérol pouvait avoir sur les kératinocytes. Ainsi, nous avons étudié la désorganisation des *lipid rafts* en les visualisant grâce à la sous-unité B de la toxine cholérique, nous avons cherché à comprendre les mécanismes de la récupération des cellules en inhibant la voie de synthèse du cholestérol avec la lovastatine, et en dosant le cholestérol cellulaire total.

Ensuite, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la déphosphorylation d'Akt en inhibant PTEN, dans l'idée de conserver la phosphorylation d'Akt après le traitement avec la M β CD, puis nous nous sommes intéressés à la PI3K, afin de déterminer si elle était en cause dans la déphosphorylation d'Akt. Ainsi, nous l'avons d'abord inhibée à l'aide de deux inhibiteurs fonctionnant de manière différente, nous avons également immunoprécipité la sous-unité p85 de la PI3K afin de définir de quelle façon elle interagit avec le récepteur de l'EGF, et pour finir, nous avons regardé sa localisation dans les kératinocytes par immunomarquage.

Ensuite, nous nous sommes directement intéressés à Akt, en regardant sa localisation dans les kératinocytes par immunofluorescence, et nous avons tenté d'isoler les *lipid rafts* par gradients de densité de saccharose et par fractionnement cellulaire, afin de déterminer si Akt y était présent.

Pour terminer, nous avons vérifié si cette déphosphorylation d'Akt pouvait mener à une mort cellulaire par induction de l'apoptose comme cela a été décrit dans plusieurs travaux (Gniadecki, 2004 ; Bang *et al*, 2005 ; Schönfelder *et al*, 2006), en testant l'activité de la caspase-3.

MATERIEL &

METHODES

Matériel et méthodes

I. Culture cellulaire

1. Culture primaire de kératinocytes humains

Les kératinocytes sont obtenus à partir des peaux excédentaires provenant d'abdominoplasties (effectuées par le Docteur B. Bienfait, de la clinique Saint-Luc de Bouge). Ces prélèvements de peau subissent plusieurs traitements afin que soient isolés les kératinocytes prolifératifs (de la couche basale), qui fournissent une souche NAK (*normal abdominoplasty keratinocytes*). La peau est d'abord conservée dans une solution physiologique à 4°C, puis transportée au laboratoire. Des morceaux de peau de 1 à 2 cm² sont découpés et déposés dans une boîte de pétri orientés avec l'épiderme vers la surface sur une solution de trypsine (Sigma) 0,17%, et de gentamycine (Gibco), ampicilline (Sigma) et fungizone (Sigma) afin de préserver au maximum les conditions de stérilité des prélèvements. Ces fragments sont laissés à incuber durant une nuit à 4°C, afin de laisser agir la trypsine qui va principalement hydrolyser les liaisons protéiques entre le derme et l'épiderme. Ensuite, le derme est séparé de l'épiderme grâce à de fines pinces, puis l'épiderme est déposé dans du milieu KGM-2 (Clonetics), c'est à dire supplémenté de KBM-2 BPE 50 µg/ml, hEGF 10 ng/ml, insuline 5 µg/ml, hydrocortisone 5x10⁻⁷ M, transferrine 5 µg/ml, épinephrine, gentamycine 50 µg/ml et amphotéricine B 50 ng/ml, ainsi que de 0,1% de sérum fœtal de veau privé de calcium (dFCS (Gibco) : la privation de calcium se faisant par dialyse au laboratoire), qui aura pour effet de stopper l'action de la trypsine. Les cellules épidermiques sont alors dissociées par action mécanique (et manuelle) et les débris de la couche cornée restants sont filtrés afin de ne récupérer que les cellules. Le tout est centrifugé 10 minutes à 200g à 4°C et le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de KGM-2. 46.000 cellules/cm² vont êtreensemencées dans des boîtes de culture de 175 cm², et dans 25 ml de milieu KGM-2 + 25µl de dFCS. Les cellules sont incubées 3 jours à 37°C, 5% de CO₂ dans une étuve adéquate, pendant lesquels il ne faut pas bouger les boîtes afin de laisser adhérer les cellules. Ensuite, le milieu est remplacé tous les 2 jours par du milieu Epilife (Cascade Biologics) additionné de HKGS (BPE 0,2%, hrEGF 0,2 ng/ml, hydrocortisone 0,18 µg/ml, insuline 5 µg/ml et transferrine 5 µg/ml de Cascade Biologics) et 50 U ou µg/ml respectivement de pénicilline-streptomycine (= milieu Epilife ⊕). Lorsque les cellules atteignent 50 à 60% de confluence, elles pourront être détachées et amplifiées par le passage en culture secondaire.

2. Culture secondaire

Pour amplifier la culture, les cellules sont détachées de la boîte de 175 cm² avec 8 ml de solution A (Glucose 10 mM, KCl 3 mM, NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, Rouge phénol 0,0033 mM et Hepès 30 mM pH 7.4) contenant de la trypsine à 0,025% et de l'EDTA disodium sel (Merck) à 0,01% pendant 5 minutes. Environ 7 ml de trypsine sont alors enlevés, afin d'éliminer les fibroblastes et les mélanocytes qui se détachent en premier, et le reste est laissé à incuber pendant 30 minutes. La boîte est ensuite tapée vigoureusement dans le but de décrocher les kératinocytes, et 10 ml de solution A additionnée de dFCS 0,1% sont ajoutés pour stopper l'action de la trypsine. Les cellules sont centrifugées à 200g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 ml de milieu Epilife ⊕ puis les cellules sontensemencées à 10.000 cellules par cm² dans des boîtes de 175 cm², dans le même milieu. Celui-ci est remplacé tous les deux jours et lorsque la culture atteint 60% de

confluence, les cellules sont détachées par la trypsine 0,025% et congelées par 1 ou 2 millions dans l'azote liquide (-196°C) dans du milieu Epilife ⊕ 60%, DMSO (Merck) 20% et dFCS 20%.

3. Culture tertiaire

Pour réaliser les expériences, les kératinocytes sont décongelés et ensemencés à 8000 cellules/cm² dans du KGM-2 puis incubés dans une étuve à 37°C, 5% de CO₂. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu Epilife ⊕, puis remplacé tous les deux jours. Lorsque les cellules ont atteint environ 60% de confluence, le milieu est remplacé par du milieu Epilife supplémenté en acides aminés (Histidine, Isoleucine, Méthionine, Tryptophane et Tyrosine (Sigma)), hydrocortisone (Sigma) et pénicilline-streptomycine (Sigma) (= milieu Epilife ⊖), mais ne contenant pas l'HKGS. Ce milieu constitue un milieu autocrine et est remplacé tous les deux jours (Minner *et al*, 2009). Pour nos expériences, les cellules ont été traitées avec la MβCD lorsqu'elles deviennent confluentes (Jans *et al*, 2004).

II. Traitements cellulaires

1. Désorganisation des lipid rafts

A confluence, les cellules sont traitées pendant une heure avec de la MβCD (7,5 mM, Sigma), puis rincées deux fois avec de la solution A avant d'être congelées à -80°C ou remises dans du milieu Epilife ⊖ pendant le temps indiqué pour les périodes de récupération.

2. Inhibition de la synthèse de cholestérol

La lovastatine est une molécule issue d'un champignon, l'*Aspergillus terreus* et qui a la propriété d'inhiber l'hydroxyméthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase, enzyme clé de la voie de synthèse du cholestérol. Cette molécule est donc utilisée pour empêcher la néosynthèse du cholestérol après la déplétion de celui-ci par la MβCD.

Ainsi, les cellules sont traitées comme au point II. 1., mais 10 μM de lovastatine (Sigma) sont ajoutées pendant toute la durée de la récupération.

3. Inhibition de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

La Wortmannine (Sigma) et le LY294002 (Calbiochem) sont deux inhibiteurs de la PI3K. Les cellules sont d'abord prétraitées pendant une demi-heure avec 500 nM de Wortmannine ou 25 μM de LY294002, puis sont traitées avec la MβCD pendant une heure comme décrit au point II. 1. en présence de l'inhibiteur, puis sont laissées en récupération en présence ou absence d'inhibiteur.

	4%
Acrylamide 40%	1 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O	6,34 ml

Tableau 1 : Composition du gel de concentration (pour 10 ml)

	7,5 %	10%
Acrylamide 40%	1,875 ml	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
APS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
H ₂ O	5,415 ml	4,84 ml

Tableau 2 : Compositions des gels de séparation (pour 10 ml)

4. Inhibition de PTEN

Le dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate (bpV (pic)) est un inhibiteur de phosphatases de phosphotyrosines indiqué pour inhiber PTEN. Les cellules sont prétraitées pendant 30 minutes avec 5 μ M de bpV (pic) puis sont traitées avec 7,5 mM de M β CD pendant une heure en présence ou absence de l'inhibiteur puis sont analysées ou laissées à récupérer dans les mêmes conditions.

III. Western blot

1. Principe

Le principe du Western blot est de séparer les protéines d'un extrait cellulaire par électrophorèse, puis de les transférer sur une membrane de PVDF ou de nitrocellulose afin de révéler la présence ou non de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps primaires, eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires, porteurs ici d'une peroxydase. Lorsqu'on va la mettre en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'enzyme peroxydase va oxyder le luminol présent dans la solution de révélation et le produit formé va émettre de la lumière qui sera détectée par une caméra CCD (*charge coupled device*) reliée à un ordinateur, permettant de visualiser et conserver nos données (ImageQuant 350, GE Healthcare).

2. Lyse cellulaire

Les cellules préservées par congélation à -80°C sont ensuite lysées dans un tampon contenant 10% de glycérol, 2% de SDS, 0,1 M de DTT et 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6.8. Le lysat est laissé pendant 5 minutes au bain-marie à 100°C afin de dénaturer les protéines, puis est centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 min.

3. Electrophorèse

18 μ l de lysat sont mélangés à 2 μ l de bleu de bromophénol 10X puis sont déposés sur un gel SDS-PAGE à 7,5 ou 10% d'acrylamide et mis à migrer pendant 2h à 100V dans du tampon de migration (Tris-base 3 g/l, Glycine 14,4 g/l, SDS 1 g/l) (Voir tableaux 1 et 2).

4. Transfert

Après la migration, les protéines séparées suivant leur masse moléculaire sont transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare) grâce à un courant d'intensité variable et d'une tension de 100V pendant deux heures, dans un tampon de transfert (Tris-base 3 g/l, glycine 14,4 g/l et méthanol 20%).

Anticorps	Firme	Isotype	Source animale
Akt	Cell Signaling	polyclonal	lapin
Phospho-Akt (S473)	Cell Signaling	monoclonal	lapin
Phospho-Akt (T308)	Cell Signaling	monoclonal	lapin
Phospho-PDK1	Cell Signaling	polyclonal	lapin
mTOR	Cell Signaling	polyclonal	lapin
Phospho-mTOR (S2448)	Cell Signaling	polyclonal	lapin
Phospho-mTOR (S2481)	Cell Signaling	polyclonal	lapin
EGFR	Cell Signaling	polyclonal	lapin
Phospho-EGFR (Y1173)	Invitrogen	polyclonal	lapin
EGFR (LA1)	Millipore	monoclonal	souris
Rictor	Cell Signaling	monoclonal	lapin
Raptor	Cell Signaling	monoclonal	lapin
Cavéoline-1	Cell Signaling	monoclonal	lapin
Flotilline-1	BD Biosciences	monoclonal	souris
p85	Millipore	monoclonal	souris
Erk 1/2	Millipore	polyclonal	lapin
Cadhérine-E	Cell Signaling	polyclonal	lapin
β -Actine	Sigma	monoclonal	souris

Tableau 3 : Caractéristiques des anticorps utilisés

5. Détection des protéines d'intérêt

Les membranes ainsi porteuses des protéines sont saturées dans une solution de *Blocking Reagent* 1%/PBS de Roche ou dans du lait Gloria à 5% dans du PBS/0,1% Tween-20 (PBS-T).

Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires (tableau 3) dilués au 1/1000^e dans la solution de saturation utilisée précédemment durant une nuit à 4°C et sous agitation. Les membranes sont ensuite rincées trois fois 5 minutes avec du PBS-T puis incubées avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG de lapin ou de souris HRP (*Horse Radish Peroxidase*) de Cell signaling dilués au 1/1000^e dans la solution de saturation, et appliqués pendant une heure sous agitation à température ambiante.

Après l'application des anticorps secondaires, les membranes sont rincées trois fois avec du PBS-T puis incubées pendant une minute dans la solution de révélation du *Chemiluminescence blocking substrate kit* de Roche et la réaction de chemiluminescence est détectée avec le système ImageQuantTM 350 de GE Healthcare, à caméra CCD refroidie à -20°C.

IV. Marquage en immunofluorescence

1. Marquage des protéines

Les cellules sontensemencées sur des lamelles couvre-objets dans une plaque 12 puits, suivant le protocole du point I.2. Après traitement(s), les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) 4% dans PBS pendant 15 minutes, rincées trois fois au PBS pendant 5 minutes et perméabilisées avec une solution de PBS contenant du Triton X-100 1% pendant 5 minutes. Ensuite, elles sont rincées trois fois avec de la BSA 0,5% dans du PBS afin de bloquer les sites aspécifiques. Puis, les cellules sont incubées avec des anticorps primaires dilués au 1/100^e dans PBS/BSA 0,5% pendant une heure et demie. Les cellules sont rincées trois fois au PBS/BSA 0,5% pendant 5 minutes puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à une sonde Alexa 488 (Invitrogen) dilué au 1/500^e dans PBS/BSA 0,5% pendant une heure à l'obscurité. Après trois rinçages au PBS de 5 minutes, le noyau des cellules est marqué avec du Topro-3 (Invitrogen), dilué 80x dans une solution RNase, pendant 20 minutes, à l'obscurité. Les cellules sont rincées trois fois au PBS puis les lamelles sont fixées sur des lames en verre à l'aide de Mowiol (Sigma) chauffé à 56°C, qui a la propriété d'aider à la conservation de la fluorescence, et conservées à 4°C. Le marquage fluorescent est observé avec un microscope à épifluorescence Olympus AX70.

2. Marquage des lipids rafts

Ce marquage s'effectue dans les mêmes conditions que précédemment, mais sur cellules vivantes. Après le traitement, les cellules sont rincées avec de la solution A. La toxine cholérique est diluée au 1/100^e dans du PBS/BSA 0,5% et incubée pendant 1h à 4°C. Les cellules sont rincées avec du PBS/BSA 0,5% trois fois pendant environ 5 minutes puis fixées au PFA 4% pendant 15 minutes, à 4°C et à l'obscurité. Après trois rinçages dans les mêmes conditions que précédemment, les cellules sont fixées au Mowiol et observées avec le microscope à épifluorescence.

V. Extraction et dosage du cholestérol

1. Extraction du cholestérol

Après traitement, les cellules sont grattées dans 1 mL d'eau déminéralisée puis soniquées à une amplitude 60 pendant 1 minute. 800 µL d'échantillon (ou d'eau pour le blanc) sont mélangés à 3 mL de chloroforme/méthanol (2/1). Le reste est conservé à -20°C pour un dosage protéique ultérieur. Les échantillons mélangés au chloroforme/méthanol sont vortexés 60 secondes et centrifugés 15 minutes à 3000 rpm. La phase organique est prélevée et remise dans un tube propre et on y ajoute 2 mL de NaCl 0,05 M. Le tout est vortexé 60 secondes et centrifugé 15 minutes à 3000 rpm. La couche supérieure est aspirée et 2 mL de CaCl₂ 0,36 M/méthanol 1/1 sont ajoutés. Le tout est de nouveau vortexé une minute et centrifugé 15 minutes à 3000 rpm. Cette étape est réalisée deux fois. La couche inférieure est prélevée et déposée dans un tube de 2 mL et 50 µL de Triton X-100 dilué 10x dans l'acétone sont ajoutés. L'acétone est évaporée à sec sous flux d'air avec le SpeedVac SC100 de Thermo Electron Corporation. Lorsqu'il ne reste plus d'acétone, la goutte de Triton X-100 est reprise dans 500 µL d'eau, vortexée et les échantillons sont conservés à -20°C.

2. Dosage des protéines

i. *Principe*

Les protéines sont dosées avec le *DC Protein Assay* de Bio-Rad dans une plaque 96 puits.

La solution A, contenant du tartrate de cuivre alcalin, doit être mélangée avec de la solution S à 20 µl/ml de solution A, lorsque les échantillons contiennent des détergents, donnant la solution A' (aucune précision n'est fournie sur la solution S). Les protéines contenues dans les échantillons vont s'associer avec le cuivre de la solution A'. L'alcalinité du milieu est importante, puisque le réactif de Folin contenu dans la solution B ne va pouvoir réduire le cuivre que s'il se trouve à un pH proche de 10 (Lowry *et al*, 1951). Le cuivre ainsi réduit apporte une couleur bleue dont l'absorbance sera mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Versamax microplate reader de Molecular Devices à une longueur d'onde de 750 nm.

Afin de déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon, les absorbances sont comparées à celles de la courbe de dilution de BSA de concentration connue, répétée à chaque essai.

ii. *Méthode*

5 µl d'échantillon ou de BSA à concentrations de 0,25 à 4 mg/ml sont mélangés à 25 µl de solution A', puis à 200 µl de solution B. La plaque est légèrement secouée puis la lecture de l'absorbance à 750 nm est réalisée entre 15 minutes et une heure après le début de la réaction.

3. Dosage du cholestérol

i. Principe

Le cholestérol est dosé à l'aide du kit *Amplex red cholesterol assay kit* de Invitrogen dans une plaque 96 puits. Le cholestérol est présent en membrane sous forme desestérifiée, tandis qu'il est sous forme estérifiée dans le reste de la cellule, donc on utilise une estérase afin de pouvoir doser tout le cholestérol cellulaire. Ensuite, le cholestérol, à présent sous forme libre, est oxydé par une cholestérol-oxydase, produisant du peroxyde d'hydrogène. En présence d' H_2O_2 , une HRP va oxyder l'Amplex Red reagent (du 10-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) qui va produire la résorufine et fluorescer. La fluorescence sera excitée à l'aide d'un spectrofluorimètre à une longueur d'onde de 571 nm et l'émission lue à une longueur d'onde de 585 nm.

Afin de déterminer la concentration en cholestérol de chaque échantillon, les fluorescences sont comparées à celles de la courbe standard de cholestérol, répétée à chaque essai.

ii. Méthode

Le cholestérol est dosé selon les instructions du fabricant. La fluorescence est mesurée à l'aide du Fluoroskan Ascent de Thermo Electron Corporation.

VI. Dosage de l'activité caspase-3

1. Principe

Le but de cette technique est de tester l'activité de la caspase-3 dans nos échantillons (étant la dernière étape de l'apoptose), afin de déterminer si l'apoptose a été enclenchée suite aux divers traitements subis par nos cellules. Afin de contrôler la réussite de l'expérience, un traitement à la camptothécine (Sigma) à 15 μM sur la nuit est réalisé, déclenchant ainsi l'apoptose jusqu'à l'activation de la caspase-3.

2. Lyse cellulaire

Après traitement, le milieu de culture des cellules est centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 50 μl de PBS (150 mM NaCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4). Les cellules sont grattées dans 1 ml de PBS et sont mélangées au culot des surnageants. Le tout est centrifugé 10 min à 1000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 μL de tampon de lyse (10 mM Hepes/KOH pH 7, 10% sucrose, 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 5 mM DTT, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinine) et incubé sur roue pendant 30 min à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé à 13 000 rpm à 4°C pendant 10 min et les surnageants sont stockés à -80°C et une partie à -20°C pour le dosage ultérieur des protéines.

3. Dosage des protéines

Voir le point V.2. N.B. : Dans ce cas-ci, le tampon de lyse dans lequel se trouvent les protéines étant trop concentré en DTT, il faut diluer les échantillons 5x dans de l'eau, afin d'atteindre une concentration en DTT qui n'interagira pas avec le kit.

4. Dosage de la fluorescence (en triplicat)

20 µg de protéines sont reprises dans 100 µL de tampon de lyse et 50 µL de tampon de réaction (40 mM PIPES pH 7,2, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% CHAPS, 0,1% sucrose, 10 mM DTT). 1 µL de substrat est ajouté dans chaque échantillon de minute en minute et les échantillons sont laissés à 37°C pendant 60 minutes dans l'obscurité. Un blanc est réalisé avec uniquement du tampon de lyse, du tampon de réaction et du substrat. La fluorescence est ensuite mesurée de minute en minute également, avec une longueur d'onde d'excitation de 400 nm et une longueur d'onde d'émission de 505 nm, à l'aide d'un spectrofluorimètre SFM25 de Kontron Instruments.

VII. Centrifugation en gradients de densité

1. Lyse cellulaire et formation des gradients

Après traitement, les cellules sont grattées dans du Base Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 250 mM sucrose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) et centrifugées 2 minutes à 250g. Le culot est repris dans 1 mL de Base Buffer + PIC (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) et les cellules sont lysées en les faisant passer dans une aiguille 21g x 3" 20 fois, puis centrifugées 10 minutes à 1000g. Le surnageant est gardé dans un autre tube et le culot est resuspendu dans 1 mL de Base Buffer + PIC. Les cellules sont à nouveau lysées en les faisant passer dans une aiguille 21g x 3" 20 fois et centrifugées 10 minutes à 1000g. Le surnageant est mélangé au premier et le tout subit une sonication pendant une minute à une amplitude 60. 2 ml d'échantillon sont déposés au fond d'un tube Beckman et mélangés à 2 ml de sucrose 90% dans Base Buffer pour former le gradient à 45%. Au dessus, sont déposés très délicatement 3 ml de sucrose 35% dans Base Buffer puis 4 mL de sucrose 21% dans Base Buffer et enfin 1 mL de sucrose 5% dans Base Buffer. Les gradients sont centrifugés à l'aide d'un rotor SW41 dans une centrifugeuse Beckman L7-65 pendant 25h à 34 000 rpm à 4°C puis divisés (à la micropipette) en 14 fractions de 850 µl chacune. Les échantillons peuvent être stockés à -20°C

2. Précipitation au TCA

Un volume de TCA 100% est ajouté à 4 volumes d'échantillon, vortexé et laissé 10 minutes sur glace. La réaction est centrifugée 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Le culot est repris dans 900 µL d'acétone 80% à -20°C et centrifugé 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C. L'acétone est aspiré et le culot est laissé à l'air libre jusqu'à l'assèchement complet de l'acétone, puis est repris dans 30 µL de tampon de lyse (Voir point III.2.). Les échantillons peuvent être stockés à -20°C avant d'être analysés par Western blot.

VIII. Immunoprécipitation

1. Principe

Le but de cette technique est de vérifier si deux protéines auxquelles nous nous intéressons, sont liées *in vivo* dans nos conditions de travail.

2. Méthode

Après traitement, les cellules sont lysées dans 100 µL de tampon non dénaturant (20 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% triton X-100) + PIC et PIB (25 mM NaNO₃, 250 mM PNPP, 250 mM β-glycérophosphate, 125 mM NaF). Le lysat est centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C afin d'éliminer les débris membranaires. Le surnageant est récupéré et est incubé avec l'anticorps précipitant sur roue pendant une nuit à 4°C.

Ensuite, les billes de protéine A sont rincées trois fois dans du PBS puis sont resuspendues dans le tampon non dénaturant + PIC et PIB. L'équivalent de 10 µl de billes est ajouté à chaque échantillon et laissées sur roue pendant au moins 3h.

Puis, les échantillons sont centrifugés 20 à 30 secondes et les culots sont rincés cinq fois avec le tampon non dénaturant + PIC et PIB.

Enfin, le culot est repris dans 20 µl de tampon de charge dénaturant (187,5 mM Tris pH 6,8, 6% SDS, 30% glycérol, 0,03% bleu de bromophénol) et bouilli 5 minutes afin de détacher les échantillons des billes. Le fond des tubes est percé afin de laisser le bleu avec les échantillons s'échapper pendant une centrifugation de quelques secondes, tandis que les billes resteront dans leur tube initial. Les échantillons peuvent être déposés sur un gel de polyacrylamide et analysés par Western blot.

IX. Fractionnement cellulaire

1. Principe

Cette méthode est celle utilisée par Jahn *et al* (2007), avec quelques adaptations relatives à notre matériel. Par cette méthode, nous voulons obtenir trois fractions cellulaires séparées, l'une contenant le cytosol, la seconde contenant les membranes plasmiques, et la troisième avec uniquement les *lipid rafts*. Pour ce faire, les cellules sont lysées dans des tampons différents et les composants sont séparés à partir de leurs propriétés physico-chimiques ou physiques dans diverses solutions.

2. Méthode

Les cellules sont ensemencées dans deux boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre par condition. Après traitement, une boîte servira pour l'extraction des *lipid rafts*, et la seconde nous permettra d'obtenir les fractions membranaires et cytosoliques.

i. Fraction des lipid rafts

Les cellules sont grattées dans un 1ml de tampon de lyse (25 mM MES pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM β -glycérophosphate, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine, PIC). Le lysat est ensuite soniqué pendant 2 minutes à une amplitude 60, puis passé dans un « Dounce homogenizer tight » afin de nous assurer que les keratinocytes soient bien détruits.

Dans un second temps, le lysat est amené à un volume de 1,5 ml, puis mélangé à un volume égal de sucrose 85%, contenant 25 mM de MES pH 6,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de Na_3VO_4 et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine, dans un tube Beckman. Au dessus, sont déposés délicatement 6 ml de sucrose 35% contenant 25 mM de MES pH 6,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de Na_3VO_4 et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine puis 3 ml de sucrose 5% contenant 25 mM de MES pH 6,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de Na_3VO_4 et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'aprotinine. Ceci forme un gradient de sucrose qui sera centrifugé à l'aide d'un rotor SW41 dans une centrifugeuse Beckman L7-65 pendant 16 heures à 34 000 rpm à 4°C.

Après la centrifugation, les *lipid rafts* sont récupérés à l'interphase des couches à 35% et 5%, dans un volume de 2 ml.

ii. Fraction cytosolique

Après traitement, les cellules sont grattées dans 1 ml de tampon d'homogénéisation (20 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,25 M sucrose, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM β -glycérolphosphate, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine, PIC). Les cellules sont soniquées pendant 2 minutes à une amplitude 60 et passées dans un « Dounce homogenizer tight ». Le lysat est centrifugé à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un second tube et le culot est repris dans 1 ml de tampon d'homogénéisation. La même centrifugation est à nouveau réalisée et le surnageant est mélangé au premier.

0,5 ml de ces surnageants sont mélangés à 4 ml de tampon d'homogénéisation dans un tube Beckman et le tout est centrifugé à l'aide d'un rotor SW55Ti dans une centrifugeuse Beckman L7-65 pendant 1h à 49 000 rpm à 4°C. Le surnageant représente la fraction cytosolique.

iii. Fraction membranaire

Le tampon est mélangé avec 30% de Percoll et 10,5 ml sont déposés dans un tube Beckman. Au dessus, sont déposés les 1,5 ml de surnageant restant du point (ii) et le tout est centrifugé à l'aide d'un rotor SW41 dans une centrifugeuse Beckman L7-35 pendant 38 minutes à 22 000 rpm à 4°C. Une bande opaque doit se former dans le tiers supérieur du gradient de Percoll ainsi formé, correspondant à la fraction membranaire.

3. Concentration de protéines

Les 3 fractions se trouvant dans un volume trop important pour pouvoir déposer suffisamment de protéines, nous devons les concentrer. Les fractions sont déposées dans un concentrateur de protéines Amicon Ultra 3K (Millipore) et centrifugés à 4000 rpm pendant 2 à 3h, à 4°C. Les échantillons récupérés sont repris dans 10 µL de tampon de lyse 5X et prêts à être analysés par Western blot.

RESULTATS

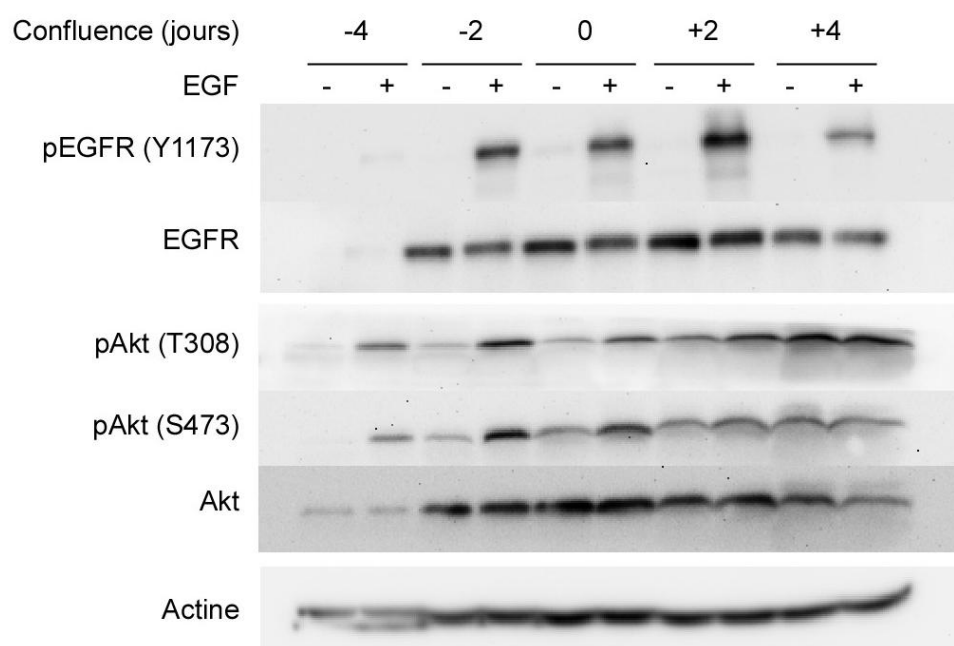


Figure 11 : Test des confluences. Après traitement pendant 20 min avec de l'EGF à 10 ng/ml, les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

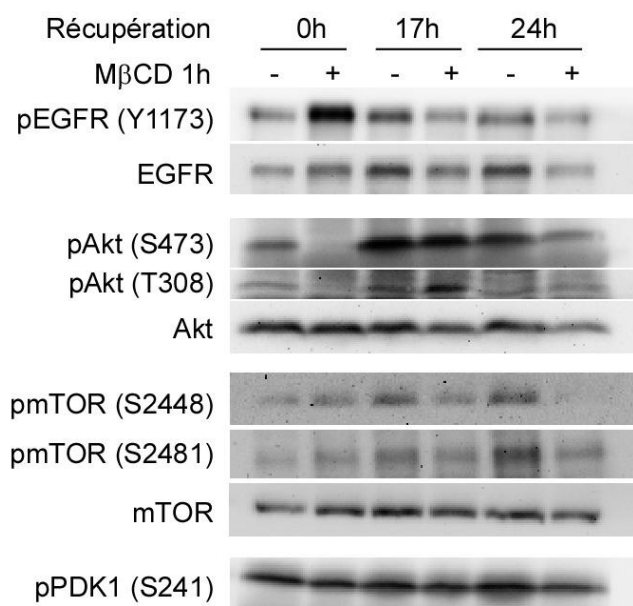


Figure 12 : Cinétique de récupération après traitement avec de la MβCD. Les cellules ont été traitées avec 7,5 mM de MβCD, suivie ou non d'une récupération aux temps définis. Les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

Résultats

I. Modèle d'analyse

1. Etude des réponses cellulaires en fonction de l'état de confluence

Dans un premier temps, nous avons étudié à quelle confluence cellulaire nous devions travailler. En effet, Poumay *et al* (1999) ont montré que la confluence des cellules avait une répercussion sur la différenciation des kératinocytes et la régulation de certains gènes, ainsi que sur la réponse des kératinocytes à l'extraction du cholestérol (Jans *et al*, 2004 ; Mathay *et al*, 2008). Nous avons donc testé l'impact de la confluence des kératinocytes sur certaines de nos protéines d'intérêt.

Nous avons mis en culture les kératinocytes, et leur profil d'expression a été analysé quatre et deux jours avant la confluence (-4 et -2), à confluence (0), et deux et quatre jours après la confluence (+2 et +4), sans stimulation ou après 20 minutes de stimulation avec de l'EGF à une concentration physiologique, soit 10 ng/ml (Figure 11). Nous pouvons constater qu'à faible confluence, la quantité de protéines n'est pas suffisante pour obtenir un signal fiable, notamment visible avec Akt total et EGFR total. De plus, on peut voir que l'état de phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 comme sur la sérine 473 est variable en fonction du stade de la confluence, et qu'à post-confluence, la phosphorylation d'Akt devient presque maximale puisqu'elle n'est plus induite en présence d'EGF. Ainsi, cette figure montre que le stade de confluence des cellules a une influence sur la signalisation des cellules, et il est donc important de toujours travailler avec des cultures cellulaires de même confluence afin d'obtenir des résultats répétables et comparables entre eux.

Aussi, toutes les expériences suivantes ont été réalisées sur des cellules qui sont au stade de la confluence.

2. Déplétion du cholestérol

Afin de vérifier que les résultats précédemment obtenus par Jans *et al* (2004) et Lambert *et al* (2006 et 2008) suite à la déplétion en cholestérol des membranes plasmiques des kératinocytes par la M β CD, nous avons traité les kératinocytes avec 7,5 mM de M β CD pendant une heure, puis nous avons permis aux cellules de récupérer dans le milieu de culture autocrine pendant 17h et 24h. Après lyse cellulaire, nous avons observé le profil d'expression d'Akt, d'EGFR, de mTOR et de PDK1 au sein de ces cellules (Figure 12). Nous pouvons constater la phosphorylation de la tyrosine 1173 d'EGFR et la déphosphorylation des deux sites d'Akt après une heure de M β CD, ce qui confirme les résultats précédemment observés (Lambert *et al*, 2006 et 2008). Après 17h et 24h de récupération, on peut constater que la phosphorylation du récepteur de l'EGF est revenue à un état basal, et qu'Akt est à nouveau phosphorylée sur ses deux sites de phosphorylation, ce qui indique que les effets de la M β CD sont réversibles, comme déjà montré précédemment (Lambert *et al*, 2008). Quant à l'augmentation de la phosphorylation d'Akt, on peut supposer qu'elle est due à un système de compensation de la cellule qui, pour rattraper les dommages causés par la déplétion en cholestérol, pourrait accélérer la voie menant à l'activation d'Akt.

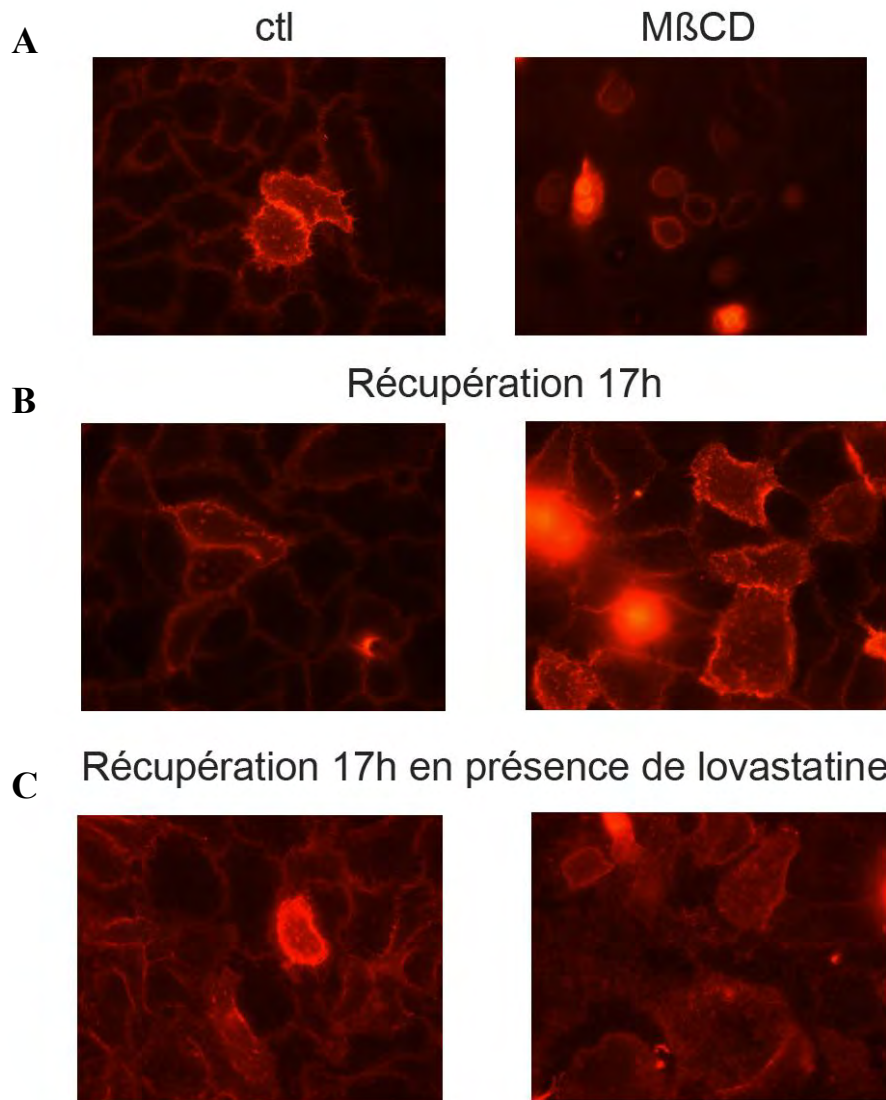


Figure 13: Visualisation des lipid rafts avec la toxine cholérique. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec de la M β CD, incubées pendant les temps indiqués dans du milieu de culture normal, incubées avec la Ctx sous-unité B et fixées avec 4% de PFA. Les cellules sont visualisées avec un microscope à épifluorescence.

L'auto-phosphorylation de PDK1 sur la sérine 241 n'est pas modifiée, montrant que PDK1 n'est pas sensible à la déplétion en cholestérol par la M β CD.

Quand à mTOR, on peut observer que l'auto-phosphorylation sur la sérine 2481 suit le même profil que la phosphorylation de la sérine 2448, celle-ci étant indirectement liée à l'activité d'Akt. Néanmoins, les résultats sur la phosphorylation de mTOR ne montrent pas une relation franche avec la phosphorylation d'Akt, ce qui nous suggère de rester prudent quant à l'interprétation de ce résultat.

Nous avons également analysé le profil d'expression de Rictor et Raptor, impliquées respectivement dans les complexes mTORC2 et mTORC1. Or, l'expression de ces protéines n'étant pas modifiée par la déplétion en cholestérol, la déphosphorylation d'Akt n'est donc pas due à une anomalie de Rictor, et cette déphosphorylation ne se répercute pas sur l'expression de Raptor.

3. Désorganisation des lipid rafts

La M β CD est connue pour désorganiser les *lipid rafts*, par l'intermédiaire de la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique (Gniadecki *et al*, 2004 ; Bang *et al*, 2005 ; Lambert *et al*, 2009). Afin de vérifier cette affirmation, nous avons marqué les *lipid rafts* en utilisant la sous-unité B de la toxine du choléra. Cette sous-unité a la propriété de fixer le ganglioside GM1, dont les *lipid rafts* sont enrichis. Néanmoins, il faut savoir qu'une seule sous-unité B de la toxine fixe plusieurs gangliosides, ce qui modifie la conformation initiale des *lipid rafts* au sein des kératinocytes.

Nous avons donc traité les cellules pendant une heure avec 7,5 mM de M β CD, et laissé récupérer les cellules pendant 17h. Sur la figure 13A, on peut voir des points rouges à la surface de certaines cellules, correspondant probablement au regroupement des *lipid rafts* par la sous-unité B de la toxine du choléra. Après une heure de traitement avec la M β CD, les points rouges ont disparu, remplacés par un marquage qui semble être majoritairement péri-nucléaire. Comme les cellules semblent se rétracter en présence de M β CD, l'étalement du cytoplasme se trouve fortement réduit. Le marquage observé dans ces conditions pourrait donc être cytoplasmique. Quoiqu'il en soit, l'absence de marquage punctiforme des *lipid rafts* suggère que la déplétion du cholestérol par la M β CD désorganise les *lipid rafts*.

Après 17h de récupération (figure 13B), on peut constater que le marquage punctiforme des *lipid rafts* est à nouveau observé, indiquant que ceux-ci ont probablement été reformés par les kératinocytes. Ceci est un argument supplémentaire pour affirmer que les kératinocytes sont capables de récupérer après une extraction du cholestérol lorsqu'on leur en laisse la possibilité.

II. Cause(s) de la récupération

Suite à la réversibilité des effets de la M β CD, nous nous sommes demandé comment la cellule pouvait rétablir son état initial. La M β CD agissant en retirant le cholestérol de la membrane plasmique, nous avons vérifié si la réversibilité était due au rétablissement de la composition de la membrane plasmique en cholestérol. Après traitement avec la M β CD, nous avons donc inhibé la voie de synthèse du cholestérol, en utilisant la lovastatine, inhibiteur

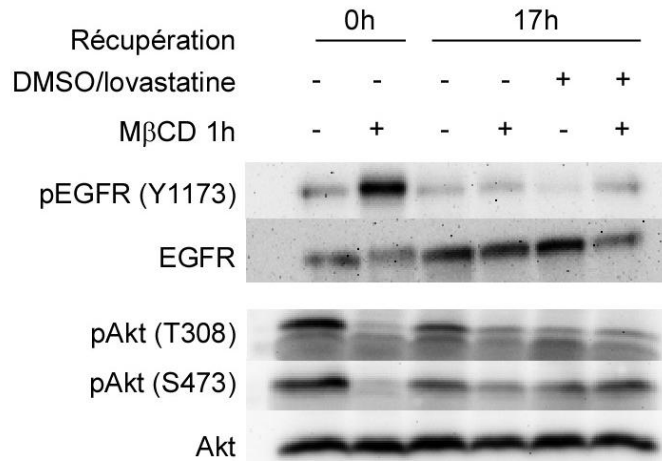


Figure 14 : Récupération en présence d'un inhibiteur de la voie de synthèse du cholestérol. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de MβCD, suivie d'une période de récupération de 17h en présence ou absence de lovastatine. Les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

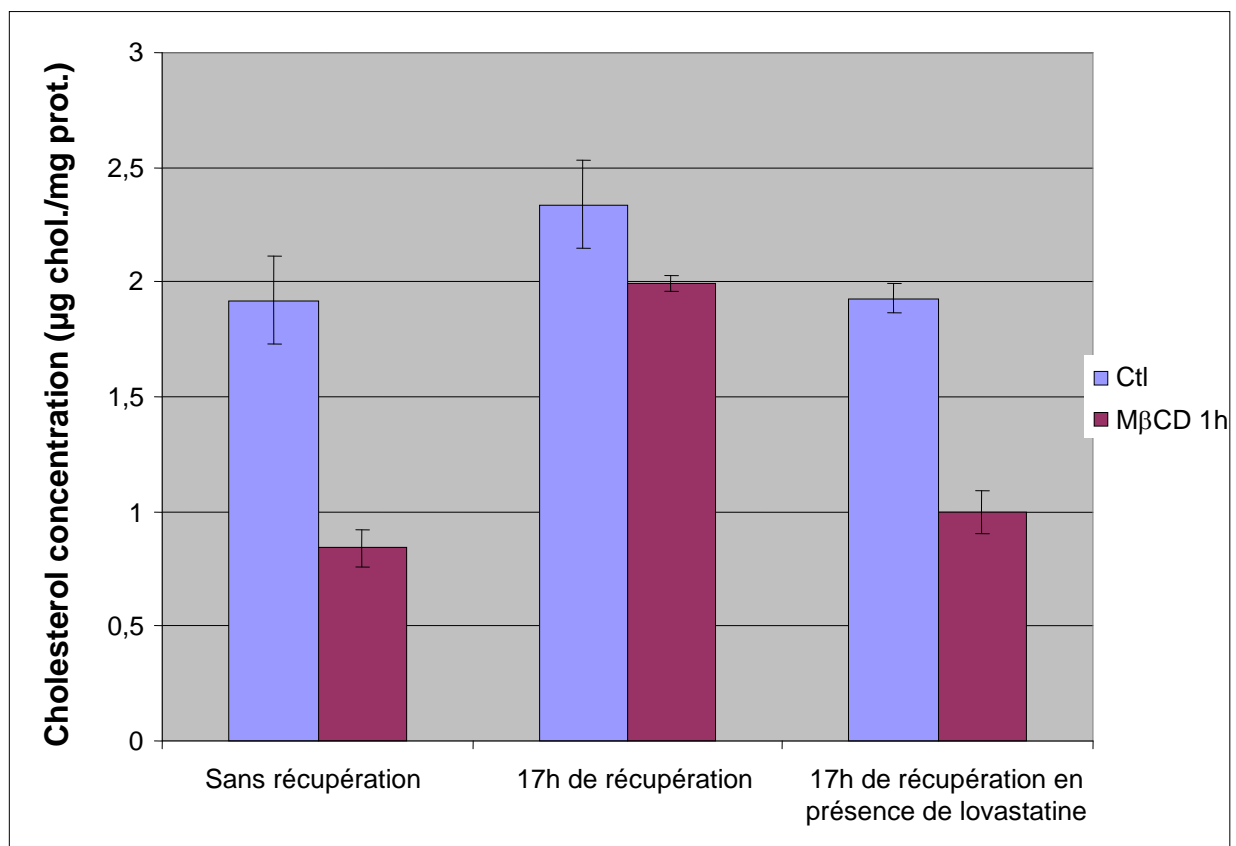


Figure 15 : Dosage du cholestérol après traitement à la MβCD et en présence de lovastatine. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de MβCD, suivie d'une période de récupération de 17h en présence ou absence de lovastatine. Le cholestérol a été extrait et mesuré avec le kit *Amplex® red cholesterol assay* (Invitrogen).

spécifique de l'HMG-CoA réductase, pendant le traitement et les 17h de récupération (Figure 14).

Sur cette figure, on peut constater la phosphorylation du récepteur de l'EGF et la déphosphorylation d'Akt après une heure de traitement avec la M β CD. Après 17h de récupération, et en absence de lovastatine, on peut remarquer comme sur la figure 12 une réversibilité des effets de la M β CD. Néanmoins, la différence d'intensité de la phosphorylation d'Akt entre l'échantillon non traité avec la M β CD après 17h de récupération et l'échantillon traité avec la M β CD après 17 h de récupération, n'a pas de réelle explication puisque cette différence n'est pas toujours observée (notamment dans la figure 12).

Après 17h de récupération en présence de lovastatine, il n'y a pas de modification de la phosphorylation pour le récepteur de l'EGF ce qui signifie que le retour du cholestérol en membrane n'est pas indispensable pour l'extinction de l'activité du récepteur. Ce phénomène peut être expliqué par l'internalisation et la dégradation du récepteur activé qui a lieu après une heure de récupération (Lambert *et al*, 2008).

Quant à Akt, on remarque une forte diminution de la phosphorylation sur ses deux sites, après 17h de récupération en présence de lovastatine, ce qui est significatif d'une diminution de son activité. Ceci montre que, contrairement au récepteur de l'EGF, l'inhibition de la voie de synthèse du cholestérol inhibe également l'activation d'Akt. On peut supposer que cette inhibition est induite par la diminution de la quantité de cholestérol qui sera envoyée en membrane, et donc la difficulté pour les cellules de réorganiser les *lipid rafts*. Ceci montrerait l'importance de l'intégrité des *lipid rafts* pour le maintien de la phosphorylation d'Akt et probablement la survie cellulaire qui en dépend.

Nous avons confirmé l'effet de la lovastatine sur la synthèse du cholestérol en mesurant la quantité de cholestérol cellulaire total (Figure 15). Après une heure de traitement avec la M β CD, le cholestérol cellulaire chute à moins de 50%. Or, la M β CD séquestrant uniquement le cholestérol membranaire, cette diminution de moitié provient majoritairement de la membrane plasmique et suggère l'important impact qu'a la M β CD sur les propriétés de la membrane.

Après 17h de récupération sans lovastatine, le niveau de cholestérol est retourné à la normale, confirmant les résultats précédents et la capacité des kératinocytes à réorganiser le cholestérol dans leur membrane plasmique. Au contraire, lorsque les cellules sont mises à récupérer en présence de lovastatine, le niveau de cholestérol reste environ à la moitié du niveau contrôle, montrant que le bon fonctionnement de la voie de synthèse du cholestérol est impliqué dans la récupération des cellules.

Enfin, le marquage des *lipid rafts* (figure 13C) montre également que les cellules, après 17h de récupération avec de la lovastatine, ne produisent pas les *lipid rafts* lorsque la voie de synthèse du cholestérol est inhibée à un stade précoce, suggérant que les kératinocytes doivent re-synthétiser du cholestérol afin de rétablir leurs *lipid rafts*.

III. Déphosphorylation d'Akt

Après la déplétion en cholestérol, nous avons constaté la déphosphorylation d'Akt, malgré que le récepteur de l'EGF soit activé. Nous nous sommes donc demandé quel élément

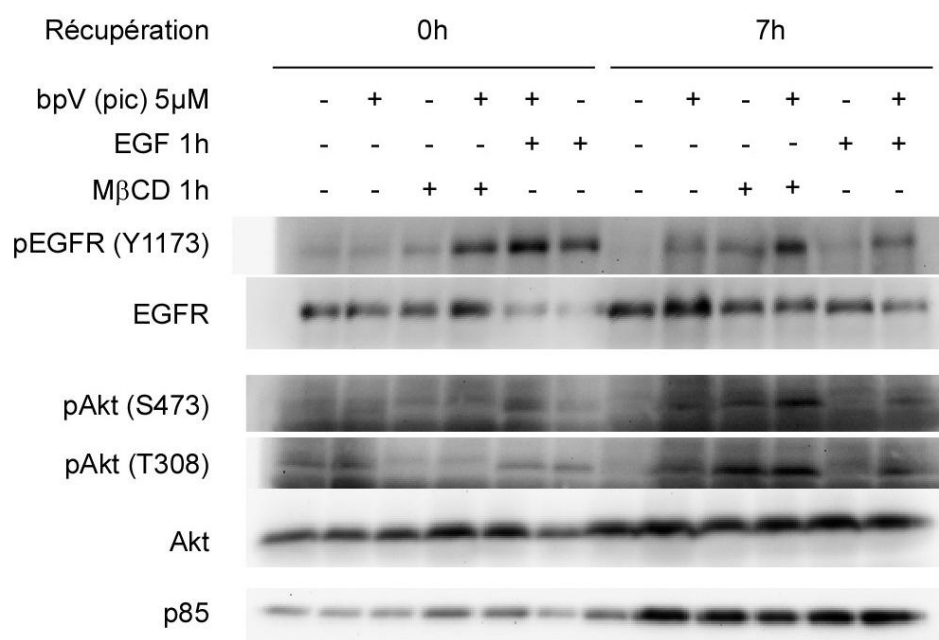


Figure 16 : Inhibition de PTEN. Les cellules ont été préincubées avec 5 μM de bpV (pic) et traitées avec 7,5 mM de MβCD ou 10 ng/ml d'EGF pendant une heure, suivie d'une période de récupération de 7h, avec ou sans l'inhibiteur. Les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

dans la voie de la PI3K, menant normalement à l'activation d'Akt, est perturbé après la déplétion en cholestérol. Nous nous sommes intéressés à PTEN. En effet, cette protéine a le rôle inverse de la PI3K puisqu'elle déphosphoryle le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2. De plus, PTEN est trouvée mutée dans de nombreux cancers, notamment de la prostate et du sein (Georgescu *et al*, 1999). Ces mutations mènent à l'inhibition de PTEN, qui ne va plus réguler la quantité de PI(3,4,5)P3 en membrane. De ce fait, Akt pourra continuellement être recruté en membrane pour y être activé, ce qui aboutit à une prolifération cellulaire excessive et continue, qui est l'une des caractéristiques indispensables du cancer.

Nous avons donc émis l'hypothèse que, si la déplétion en cholestérol provoquée par la M β CD conduit à une suractivation de PTEN, cela pourrait expliquer la déphosphorylation d'Akt observée dans ces conditions. Ainsi, nous avons utilisé un inhibiteur de PTEN, le bpV (pic) à une concentration de 5 μ M, puis nous avons étudié les effets de la M β CD sur la déphosphorylation d'Akt. Nous avons d'abord prétraité les cellules avec l'inhibiteur pendant 30 minutes, puis nous avons déplété le cholestérol avec la M β CD pendant 1 heure, en présence ou absence de l'inhibiteur, et nous avons laissé récupérer les cellules pendant 7 heures dans du milieu normal et en présence ou absence de l'inhibiteur (figure 16).

Sans traitement et en présence de bpV (pic), on peut voir que les phosphorylations d'Akt sont légèrement plus importantes que dans l'échantillon n'ayant pas eu l'inhibiteur. Cette différence de phosphorylation peut indiquer un effet de l'inhibiteur sur PTEN, réduisant la déphosphorylation d'Akt. Aussi, après une heure de traitement avec de l'EGF suivie de 7 heures de récupération, on constate que les phosphorylations d'Akt sont maintenues, indiquant que l'inhibiteur est toujours actif après 7 heures d'activité, et suggère également qu'il est impliqué dans la régulation négative normale d'Akt.

Après une heure de traitement à la M β CD, les phosphorylations d'Akt disparaissent, même en présence de bpV (pic). Ce résultat suggère que PTEN pourrait ne pas être impliquée dans la déphosphorylation d'Akt provoquée par la M β CD.

Après 7h de récupération, les phosphorylations d'Akt sont absentes dans l'échantillon non traité avec la M β CD mais présente lorsque PTEN est inhibée, et revenue dans les échantillons traités avec la M β CD. En présence de l'inhibiteur et après le traitement avec la M β CD, on peut voir une très légère différence de phosphorylation, où celle-ci est plus importante que dans les échantillons traité avec la M β CD mais en absence de l'inhibiteur.

Quant au récepteur de l'EGF, on peut constater qu'il n'est pas phosphorylé lorsque les cellules ne sont soumises à aucun traitement, et n'est que très faiblement phosphorylé après une heure de traitement avec la M β CD, contrairement à ce qu'on a pu voir jusqu'à maintenant. Mais, en présence de l'inhibiteur et/ou d'EGF, on trouve une forte phosphorylation du récepteur. Après 7h de récupération, on ne retrouve le récepteur faiblement phosphorylé quasiment qu'en présence de l'inhibiteur de PTEN. Ainsi, on peut remarquer que le récepteur est chaque fois plus fortement phosphorylé en présence de l'inhibiteur qu'en son absence. Ceci peut être simplement expliqué par le fait que l'inhibiteur utilisé est également un inhibiteur de protéines tyrosine phosphatases. Mais, cette molécule a été montrée comme inhibitrice de PTEN pour des doses cent fois moindres que les doses auxquelles elle est capable d'inhiber les protéines tyrosine phosphatases (Schmid *et al*, 2004). Néanmoins, nous n'avons trouvé aucune donnée dans la littérature relative aux concentrations à utiliser pour inhiber PTEN dans les kératinocytes épidermiques humains. Nous avons seulement testé un traitement de 1h30 avec 200 nM, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M et 5 μ M, et seul le

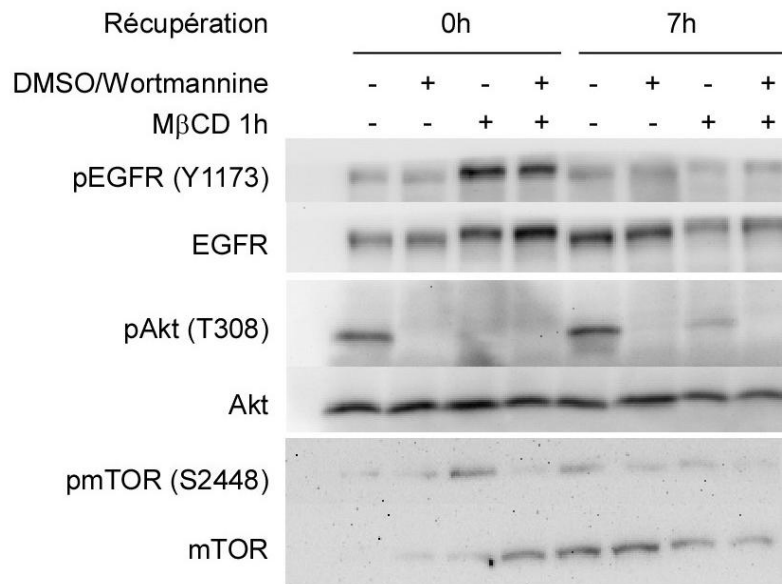


Figure 17: Inhibition de la PI3K avec la wortmannine. Les cellules ont été préincubées avec 500 nM de wortmannine et traitées avec 7,5 mM de MβCD pendant une heure, suivie d'une récupération de 7h, avec ou sans l'inhibiteur. Les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

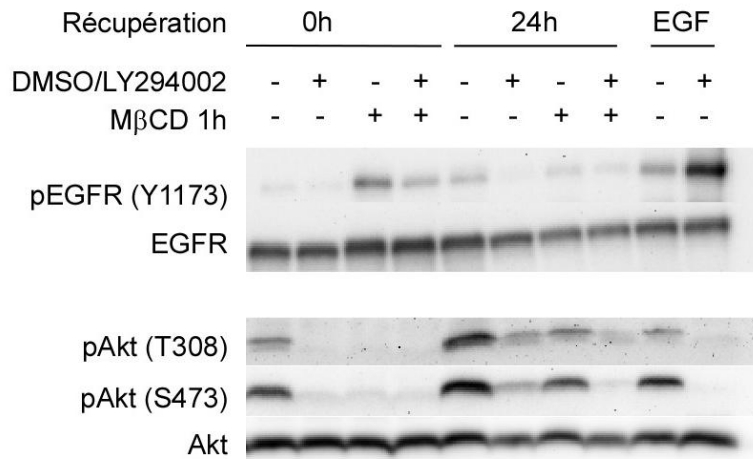


Figure 18 : Inhibition de la PI3K avec le LY294002. Les cellules ont été préincubées avec 25 μM de LY294002 et traitées avec 7,5 mM de MβCD pendant une heure, suivie d'une récupération de 24h, ou traitées avec 10 ng/ml d'EGF pendant 20 minutes, avec ou sans l'inhibiteur. Les lysats cellulaires ont été analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

traitement de 5 μM a montré une différence entre l'échantillon traité avec l'inhibiteur et le non traité (données non montrées). Ainsi, on peut facilement imaginer que cet inhibiteur peut aussi agir sur certaines protéines phosphatases pouvant déphosphoryler le récepteur de l'EGF.

IV. Rôle de la PI3K

1. Inhibition de la PI3K

On sait qu'Akt est recrutée en membrane grâce à son interaction avec principalement le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$. Celui-ci étant formé par la PI3K, nous avons inhibé cette enzyme, afin d'étudier son rôle dans les effets de la M β CD. Pour cela, nous avons utilisé deux inhibiteurs : la wortmannine et le LY294002, inhibiteur plus spécifique de la PI3K que la wortmannine. Les cellules ont d'abord été prétraitées pendant 30 minutes avec l'un des inhibiteurs, puis traitées pendant une heure avec 7,5 mM de M β CD, en présence ou absence d'inhibiteur, puis elles ont été analysées ou laissées à récupérer pendant les temps indiqués dans du milieu neuf, avec ou sans l'inhibiteur, puis analysées.

i. Wortmannine

Sur la figure 17, on remarque pour le récepteur de l'EGF une activation après une heure de M β CD, en présence comme en absence de wortmannine, et cette phosphorylation disparaît après 7h de récupération. Ainsi, l'inhibition de la PI3K ne semble pas avoir d'effet sur l'activation du récepteur, vraisemblablement par le fait que la PI3K se trouve en aval du récepteur.

Akt est déphosphorylée après une heure de M β CD, aussi en présence de wortmannine, dans les échantillons traités comme non traités. Après 7h de récupération, on retrouve l'activation d'Akt dans l'échantillon contrôle, et dans l'échantillon qui a seulement été traité avec la M β CD, bien que cette activation soit plus faible que dans le contrôle. En présence de wortmannine, Akt n'est plus phosphorylée. Dans un premier temps, ce résultat confirme que le recrutement en membrane d'Akt par le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, et donc l'activité de la PI3K est indispensable à l'activation d'Akt. Aussi, ce résultat nous permet de supposer que la M β CD empêche l'activation d'Akt en agissant sur l'activité de la PI3K, peut-être de façon indirecte.

ii. LY294002

Dans le cas de l'inhibition de la PI3K avec le LY294002 (Figure 18), nous obtenons un profil similaire à celui de la wortmannine. Le récepteur de l'EGF est activé après une heure de M β CD et le signal diminue de façon importante après 24h de récupération. Néanmoins, sur cette figure, il semble que la phosphorylation du récepteur soit encore plus diminuée en présence de LY294002. Toutefois, une telle diminution n'a pas été observée sur tous les Western blots réalisés après traitement avec cet inhibiteur. Ceci peut être dû aux variations expérimentales. A l'inverse, le récepteur est fortement phosphorylé en présence d'EGF et d'inhibiteur, mais pas en présence d'EGF et en absence de l'inhibiteur, ce qui est contradictoire avec l'expérience précédente, et est difficile à expliquer, l'inhibiteur devant agir en aval du récepteur.

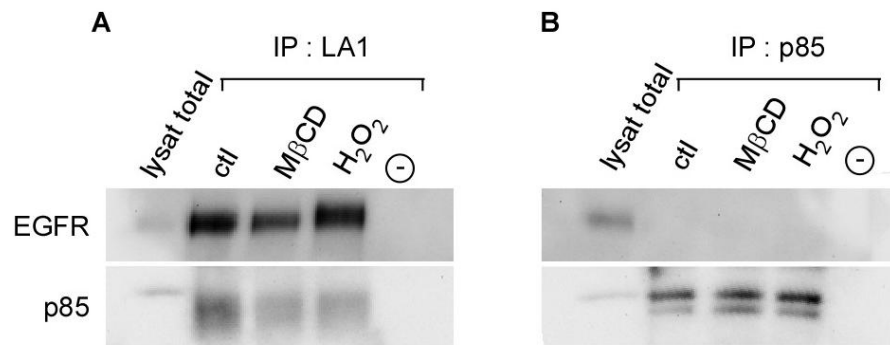


Figure 19 : Immunoprécipitation d'EGFR et de la sous-unité p85 de la PI3K afin de déterminer leur interaction éventuelle. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de MβCD, ou pendant 20 minutes avec X de H₂O₂, et EGFR ou p85 ont été immunoprécipités et analysés après migration sur un gel de polyacrylamide 7,5% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

Akt est déphosphorylée en présence de l'inhibiteur et/ou de M β CD, confirmant l'expérience avec la wortmannine. Après 24h de récupération, la phosphorylation est récupérée, même après le traitement avec la M β CD, mais est très faible en présence de l'inhibiteur. Aussi en présence d'EGF, qui induit fortement l'activation d'Akt, l'inhibiteur de la PI3K mène à l'inhibition de la phosphorylation d'Akt, et ainsi de son activation.

Ces résultats confirment les résultats obtenus en utilisant la wortmannine, ce qui confirme également que ces résultats sont bien dus à une inhibition de la PI3K, et non pas à un effet aspécifique de la wortmannine.

2. Colocalisation PI3K-EGFR

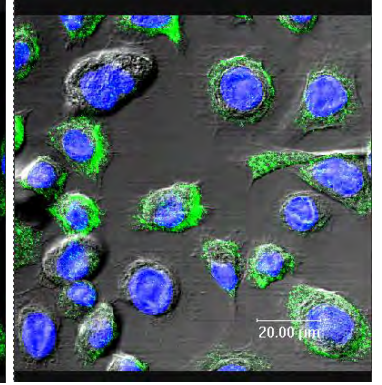
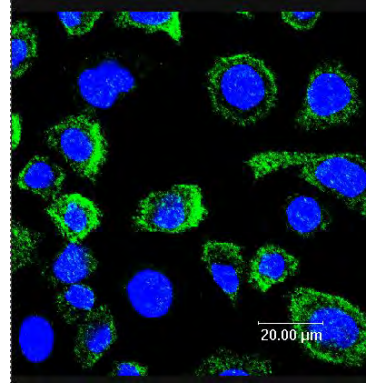
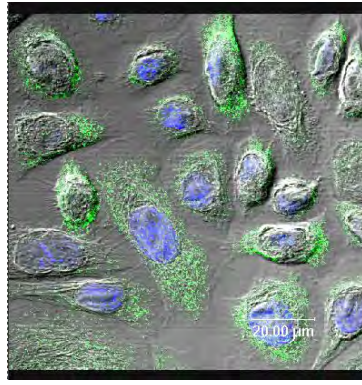
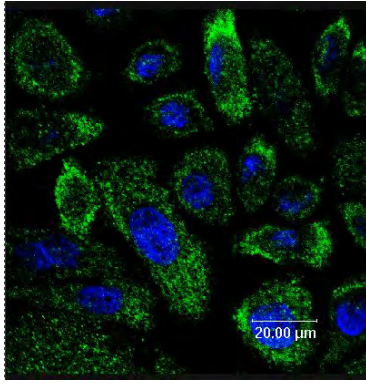
Une étude réalisée par Jahn *et al* (2007) et portant sur le récepteur Kit présent dans les cellules souches hématopoïétiques, montrait que ce récepteur à activité tyrosine kinase était présent dans les *lipid rafts*, à l'instar du récepteur de l'EGF. Ils ont montré que ce récepteur, lorsqu'il est activé, active la PI3K par recrutement dans les *lipid rafts* de sa sous-unité p85, tandis que la sous-unité p110 est constitutivement présente dans les *lipid rafts*. Nous avons donc voulu tester si dans nos conditions, le récepteur de l'EGF recrute la sous-unité p85. Nous avons donc immunoprécipité le récepteur et analysé le résultat par Western blot avec un anticorps reconnaissant p85. Afin de repérer la hauteur à laquelle nous devions retrouver notre bande d'intérêt, un lysat protéique de cellules n'ayant subi aucun traitement particulier a été déposé à côté de nos échantillons immunoprécipités (« lysat total »).

Figure 19A, nous pouvons remarquer que p85 ne ressort pas, même lorsque les cellules sont stimulées avec de l'H₂O₂, qui active le récepteur de l'EGF, ou avec l'EGF lui-même (non montré). Afin de s'assurer que l'immunoprécipitation ainsi que le Western blot ont correctement fonctionné, nous avons appliqué un anticorps visé contre le récepteur de l'EGF, et celui-ci est bien présent dans toutes les pistes, à l'exclusion du témoin négatif (⊖) dans lequel nous n'avons pas mis d'anticorps précipitant LA1.

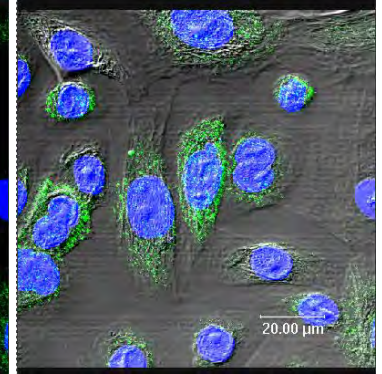
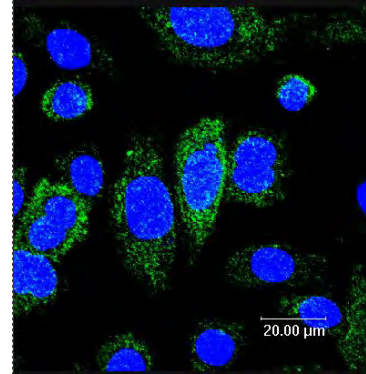
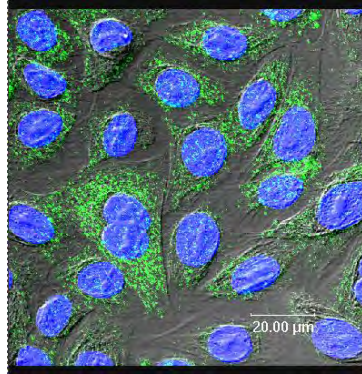
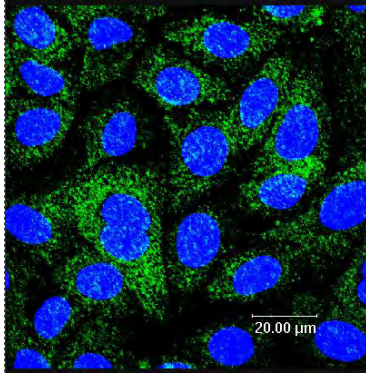
Nous avons aussi réalisé l'expérience inverse en immunoprécipitant p85 et en analysant les résultats par Western blot avec un anticorps reconnaissant le récepteur de l'EGF (Figure 19B). Ici aussi, le récepteur n'est pas présent, tandis que l'incubation avec un anticorps dirigé contre p85 émet un signal, donc l'immunoprécipitation a bien sélectionné p85.

Ainsi, il semblerait que le récepteur n'interagisse pas avec la sous-unité p85, même lorsque l'on force l'activation d'EGFR. Nous pouvons supposer que, soit l'EGF et l'H₂O₂ entraînent une activation du récepteur, reconnue dans nos résultats précédents par la phosphorylation de la tyrosine 1173, mais pas la phosphorylation de la tyrosine 920 du récepteur, tyrosine qui est connue pour activer la PI3K (Jorissen *et al*, 2003). La deuxième possibilité serait que le récepteur de l'EGF, dans les kératinocytes épidermiques humains, ne recrute pas la sous-unité p85 de la PI3K comme cela a été montré avec le récepteur Kit, et que la PI3K soit donc activée par l'intermédiaire d'un ou plusieurs autre(s) récepteur(s).

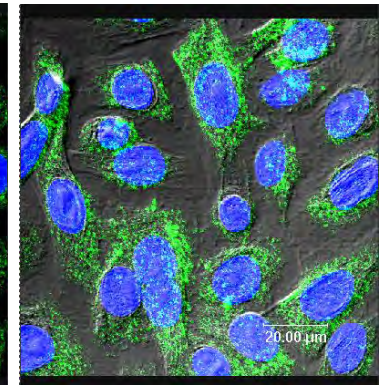
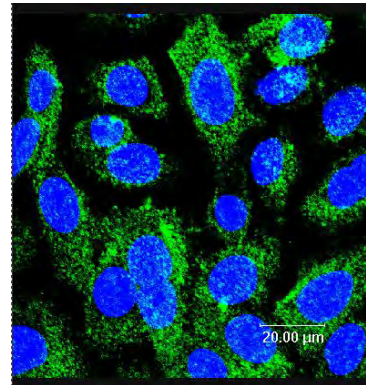
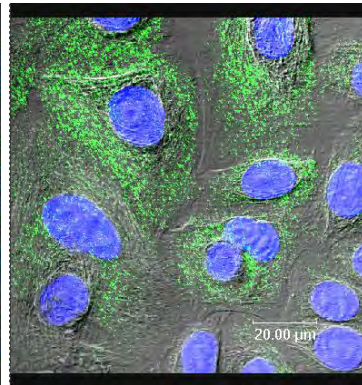
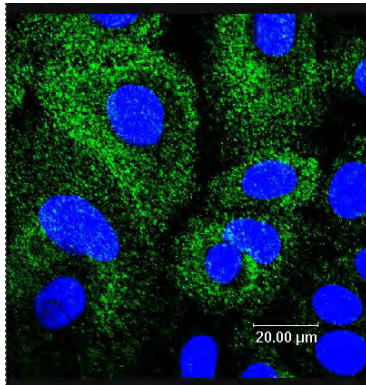
Ctl

M β CD

7h de récupération



17h de récupération



EGF 10 ng/ml

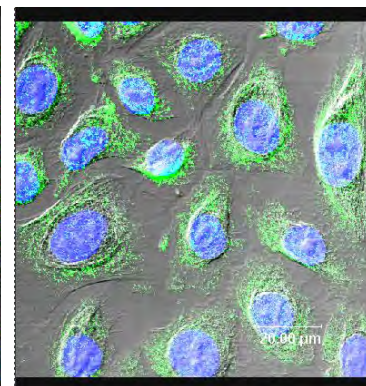
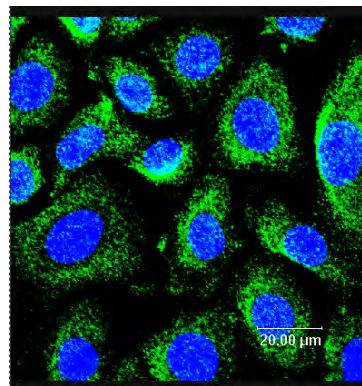


Figure 20 : Marquage de p85 après traitement à la M β CD. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de M β CD suivie d'une période de récupération aux temps indiqués, ou traitées pendant 20 minutes avec 10 ng/ml d'EGF, fixées avec 4% de PFA et perméabilisées avec 1% de Triton X-100. Un anticorps anti-p85 a été utilisé, et les noyaux ont été marqués avec le Topro, et les cellules ont été visualisées par microscopie confocale.

V. Localisation des protéines d'intérêt

1. Localisation visuelle

i. p85

Comme les résultats précédents n'ont pas montré une interaction EGFR-p85, nous sommes demandé quelle était la localisation de la sous-unité p85, si elle était présente en membrane dans nos cellules, comme dans les cellules leucémiques (Jahn *et al*, 2007), et s'il y avait un changement de localisation de p85 après le traitement avec la M β CD. On peut constater sur la figure 20 que p85, dans la condition contrôle, est présente dans le cytoplasme des cellules. Grâce à la superposition avec la photo en contraste de phase, nous pouvons voir avec précision que p85 n'est absolument pas présente au niveau de la membrane plasmique. Bien que ce marquage soit en corrélation avec les résultats précédents, il ne correspond pas avec les données montrées par Jahn *et al* (2007). Néanmoins, les conditions de travail et les cellules étant différentes, cela peut aboutir à des résultats différents.

Après une heure de traitement avec la M β CD, on peut voir que le marquage est sensiblement identique au contrôle. Il est intéressant ici de s'arrêter sur la forme des cellules, visibles avec les photos en contraste de phase. En effet, dans ces conditions, les cellules sont très condensées et nous pouvons voir les filopodes formés par les cellules en se contractant, comme cela a déjà été observé précédemment (Lambert, 2009).

Après 7h et 17h de récupération, le marquage est toujours identique, avec p85 présente dans le cytoplasme, et absente du noyau et surtout de la membrane. Ceci semble indiquer que la PI3K pourrait avoir un mode de fonctionnement différent dans les kératinocytes que dans les cellules leucémiques.

ii. Akt

Afin de déterminer la localisation d'Akt au sein des kératinocytes, et en fonction de nos conditions de travail, nous avons marqué par immunofluorescence cette protéine.

La figure 21 nous montre que dans les conditions contrôles, Akt est présente de façon ubiquiste dans les cellules : dans le noyau, le cytoplasme, ainsi qu'en membrane. Néanmoins, les formes phosphorylées sont plus difficiles à visualiser, et on les retrouve principalement dans le cytoplasme et un peu dans le noyau de certaines cellules, tandis que la forme totale est présente dans toutes les cellules. De plus, le marquage des formes phosphorylées n'est pas péri-nucléaire, ce qui suggère que les protéines nouvellement synthétisées ne sont pas phosphorylées, confirmant la nécessité du recrutement en membrane pour activer Akt.

Les cellules qui ne sont pas marquées par les formes phosphorylées peuvent être dues à une sensibilité plus faible des anticorps primaires, par rapport à l'anticorps dirigé contre la protéine totale. Mais, elle peut également indiquer que toutes les cellules n'ont pas toujours la protéine Akt sous la forme phosphorylée. Cette hypothèse peut suggérer soit qu'Akt sous forme phosphorylée n'est pas nécessaire en permanence pour la survie cellulaire, et que la phosphorylation peut se faire suite à des signaux particuliers lorsque le besoin se fait ressentir.

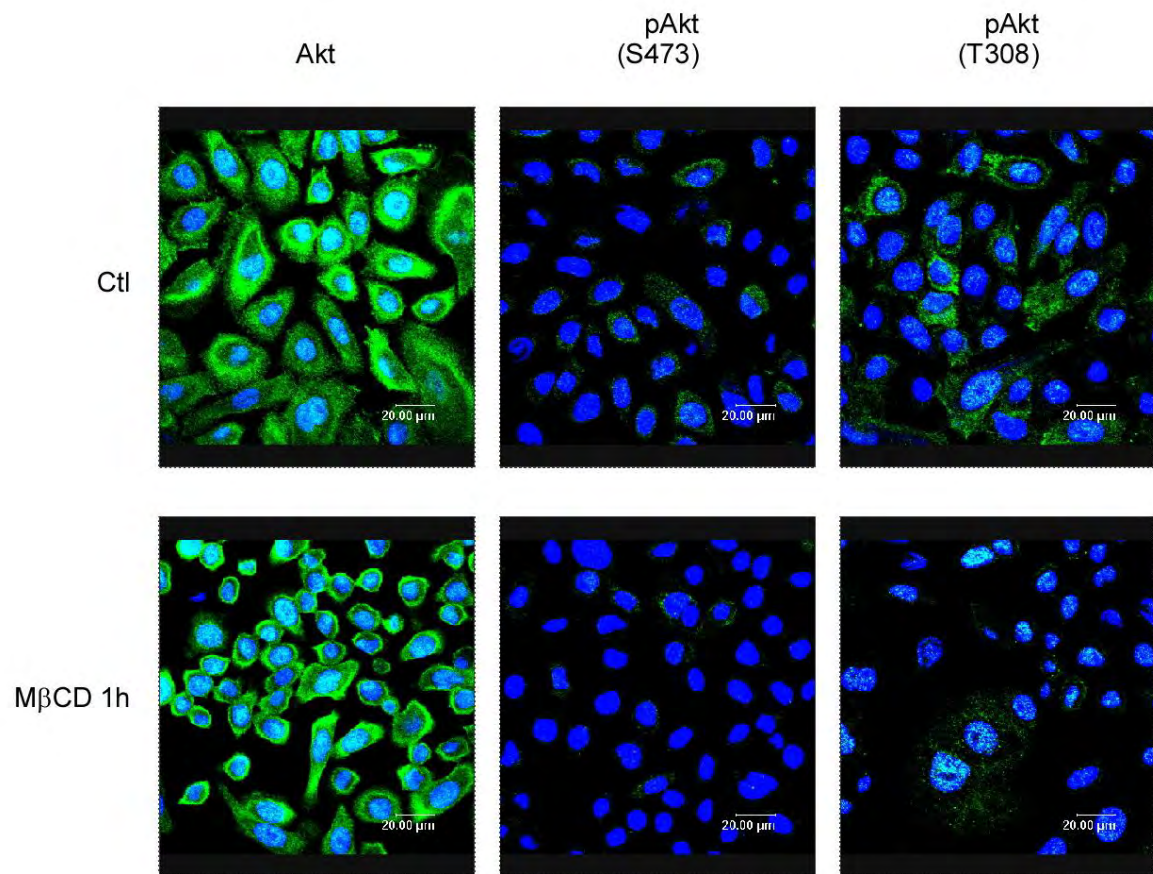


Figure 21 : Marquage d'Akt après traitement à la MβCD. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de MβCD, fixées avec 4% de PFA et perméabilisées avec 1% de Triton X-100. Des anticorps anti- Akt ou phospho-Akt ont été utilisés, et les noyaux ont été marqués avec le Topro, et les cellules ont été visualisées par microscopie confocale.

au niveau des cellules (suite à un stress, par exemple), soit que l'activation se fait de façon cyclique, et qu'après l'activation d'Akt suit une période de « repos » pendant laquelle les répercussions du signal peuvent toujours avoir lieu (dans le noyau par exemple), ce qui serait expliqué par les quelques cellules dont seul le noyau est marqué ; ou qu'une période de repos suit la fin du signal, et qu'Akt serait sous forme non phosphorylée afin de limiter la prolifération cellulaire ainsi que les autres phénomènes biologiques dans lesquels est impliquée Akt.

Après une heure de traitement avec la M β CD, il n'y a pas de modification au niveau de la forme totale d'Akt. Mais, pour les formes phosphorylées, on peut remarquer qu'il reste très peu de cellules marquées par rapport aux contrôles, et que ce marquage est principalement situé dans le noyau. Ceci suggère que la déplétion du cholestérol par la M β CD induirait la déphosphorylation d'Akt présente dans le cytoplasme et en membrane ou empêcherait sa phosphorylation (via l'inhibition du recrutement en membrane). Mais on peut aussi supposer que les formes phosphorylées qui étaient présentes dans le noyau avant le traitement pourraient y être séquestrées suite à la déplétion en cholestérol, et peut-être que par un mécanisme encore indéfini, les formes phosphorylées qui peuvent s'échapper du noyau seraient alors déphosphorylées.

Mais, tous les mécanismes abordés ici ne sont pas encore compris à notre connaissance, et ils mériteraient de plus amples investigations afin de découvrir de quelle(s) façon(s) Akt migre dans le cytoplasme puis dans le noyau, et comment elle est déphosphorylée et régulée suite à un signal d'activation.

2. Analyse des lipid rafts

Certains auteurs ayant montré que le récepteur de l'EGF ainsi qu'une certaine proportion d'Akt pouvaient se trouver dans les *lipid rafts*, nous nous sommes demandé ce qu'il en était dans les kératinocytes. Nous avons analysé la localisation de ces protéines par des gradients de densité de saccharose. Afin de repérer la ou les fractions contenant les *lipid rafts*, nous avons recherché deux protéines : la flotilline-1 et la cavéoline-1. Ces protéines sont couramment utilisées comme marqueurs des *lipid rafts*, la cavéoline-1 étant trouvée dans les cavéoles qui sont des portions de membranes considérées comme faisant partie des *lipid rafts* à cause de leur composition en lipides. Figure 22, nous pouvons voir que, dans l'échantillon contrôle, la flotilline-1 et la cavéoline-1 ont sensiblement le même profil : une plus forte proportion dans les fractions 7 et 8 (et 9 pour la cavéoline-1), et une concentration importante dans les fractions les plus denses, c'est-à-dire les fractions 13 et 14.

Curieusement, Akt et le récepteur de l'EGF suivent également le même profil, c'est-à-dire qu'on les retrouve principalement dans les fractions moyennement denses : 7 et 8 pour le récepteur, et 8 et 9 pour Akt. Mais aussi, on les retrouve dans les fractions les plus denses, à savoir dans la fraction 13 pour le récepteur et les fractions 11 à 14 pour Akt.

Après une heure de M β CD, on peut voir que les deux marqueurs des *lipid rafts* ne sont plus concentrés que dans les fractions les plus lourdes, montrant une réelle désorganisation des *lipid rafts*. Pour le récepteur de l'EGF et Akt, leurs profils sont modifiés également, et on les retrouve principalement dans les fractions 11 à 13. Cette modification à l'identique de ces deux protéines suggère que le récepteur et Akt se trouvent dans les mêmes compartiments membranaires.

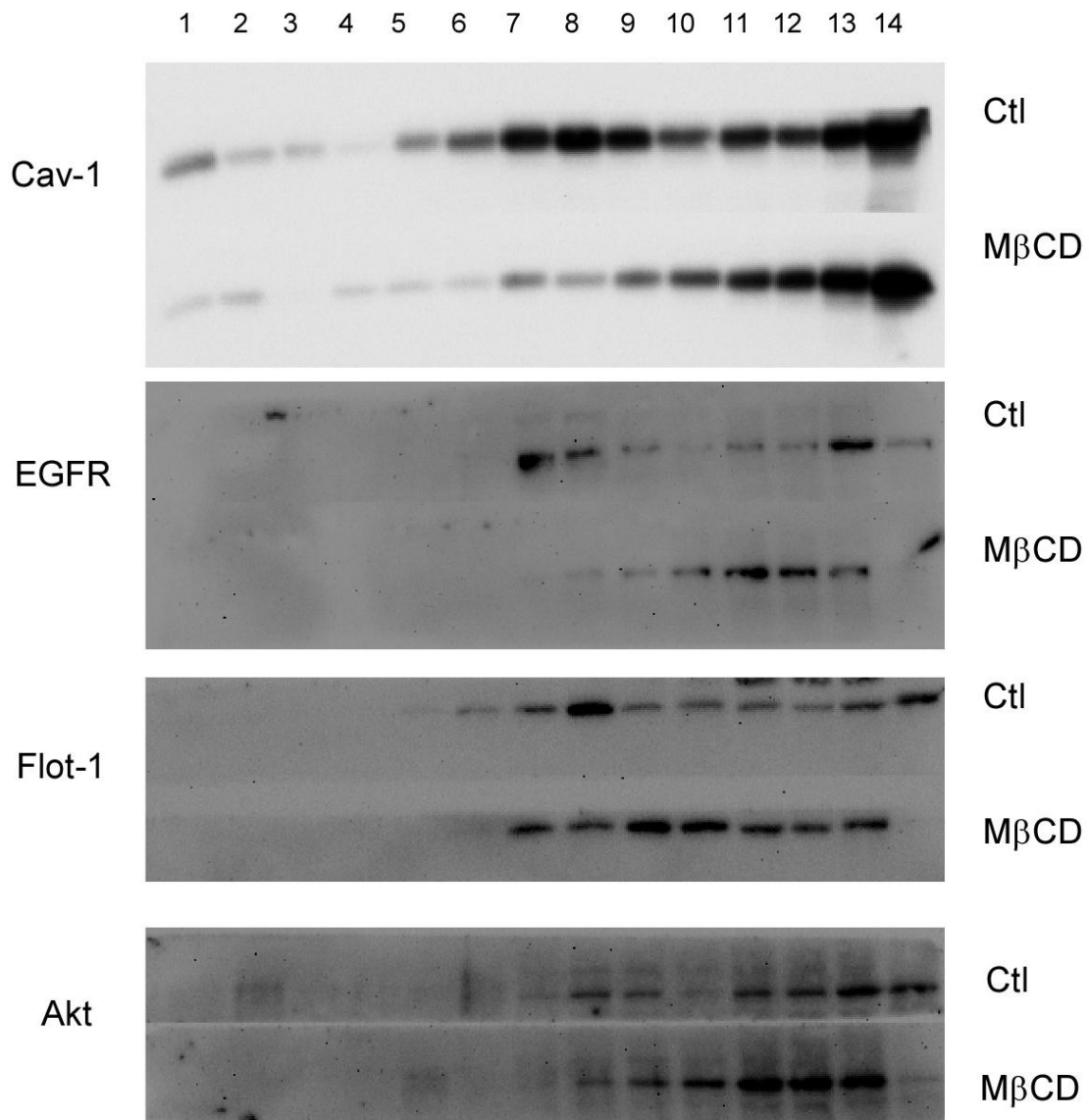


Figure 22 : Séparation des lipid rafts. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM de MβCD. Les extraits membranaires ont été séparés par ultracentrifugation et les fractions ont été analysées après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

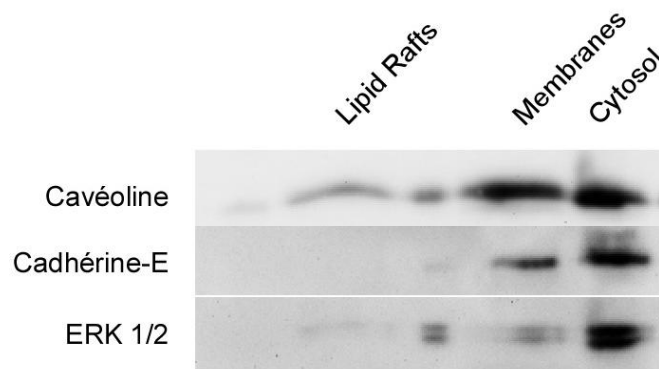


Figure 23 : Séparation des compartiments cellulaires. Les cellules ont été cultivées jusqu'à la confluence. Les différentes fractions ont été obtenues par ultracentrifugations. Les lipid rafts ont été isolés par gradients de densités de saccharose, et la fraction membranaire par gradient de Percoll. Les fractions ont été analysées après migration sur un gel de polyacrylamide 10% et détectés par Western blot avec les anticorps appropriés.

Ces observations semblent indiquer que le récepteur de l'EGF ainsi qu'Akt pourraient se trouver dans les *lipid rafts*. Mais lorsqu'on observe la cavéoline-1, on peut constater qu'elle est présente dans toutes les fractions pour les cellules traitées, comme pour les non-traitées. Ainsi, même si cette technique nous apporte quelques informations en nous montrant certains profils de localisation dans les gradients de saccharose concordants, elle n'est néanmoins pas assez précise pour déterminer quelle(s) fraction(s) contien(nen)t les *lipid rafts*, ni pour tirer de réelles conclusions quant à la localisation dans la membrane d'Akt et du récepteur de l'EGF.

3. Analyse des différents compartiments cellulaires

Par la suite, nous avons essayé de séparer différentes fractions cellulaires (le cytosol, les membranes et les *lipid rafts*), afin de repérer des changements de localisation au sein de la cellule. Cette technique étant tirée d'une étude effectuée sur des cellules leucémiques (Jahn *et al*, 2007), il a fallu l'adapter aux kératinocytes, cellules adhérentes, et plus résistantes aux contraintes mécaniques que les cellules leucémiques. Nous avons néanmoins réussi à isoler la fraction des *lipid rafts*, mais nous n'avons pas réussi à purifier les fractions membranaires et cytosoliques (Figure 23).

Dans l'espoir de voir si Akt était présente dans cette fraction des *lipid rafts*, nous avons incubé un anticorps contre Akt, mais aucun signal visible n'est apparu. Ceci peut être dû au fait que nous avons travaillé avec une quantité plus faible de cellules que ne le faisaient Jahn *et al* avec les cellules leucémiques, nous apportant vraisemblablement moins de matériel protéique. Et, le signal de la cavéoline-1 étant relativement faible sur la figure 23, cela peut confirmer cette hypothèse. Néanmoins, comme Akt est connue pour migrer dans le cytosol après activation à la membrane, nous nous attendions à le retrouver aussi dans les autres fractions, d'autant plus qu'elles n'étaient pas purifiées. Malheureusement, cette technique n'a pas pu être suffisamment approfondie pour en savoir davantage.

VI. Recherche d'activité apoptotique

Comme nous l'avons déjà constaté à plusieurs reprises, Akt est déphosphorylée après un traitement avec une heure de M β CD. Akt ayant un rôle anti-apoptotique au sein des cellules, et notamment des kératinocytes, nous avons émis l'hypothèse que cette déphosphorylation d'Akt pouvait engendrer un signal apoptotique chez les kératinocytes. Nous avons donc analysé l'activité de la caspase-3 après traitement avec la M β CD et après différents temps de récupération, pour éventuellement voir une diminution de l'activité de la caspase-3 lors du processus de récupération de l'état normal des kératinocytes. Bien que certaines voies apoptotiques ne passent pas par l'activation de cette caspase, nous nous sommes d'abord intéressés à la caspase-3 car elle est impliquée dans la plupart des voies apoptotiques, et son activation est caractéristique d'un point de non-retour atteint par les cellules dans le processus apoptotique.

Sur la figure 24, Nous pouvons constater que le niveau d'activité de la caspase-3 après traitement avec la M β CD n'est pas plus élevé que dans l'échantillon n'ayant pas subi de traitement. Après les différents temps de récupération, les niveaux d'activité de la caspase-3 restent constants, que les cellules aient subi un traitement ou non. Aussi, des essais ont été réalisés en appliquant un traitement de 3h et 5h avec 7,5 mM de M β CD (non montré), qui n'induisaient pas d'activation significative de la caspase-3, confirmant la faible incidence pro-

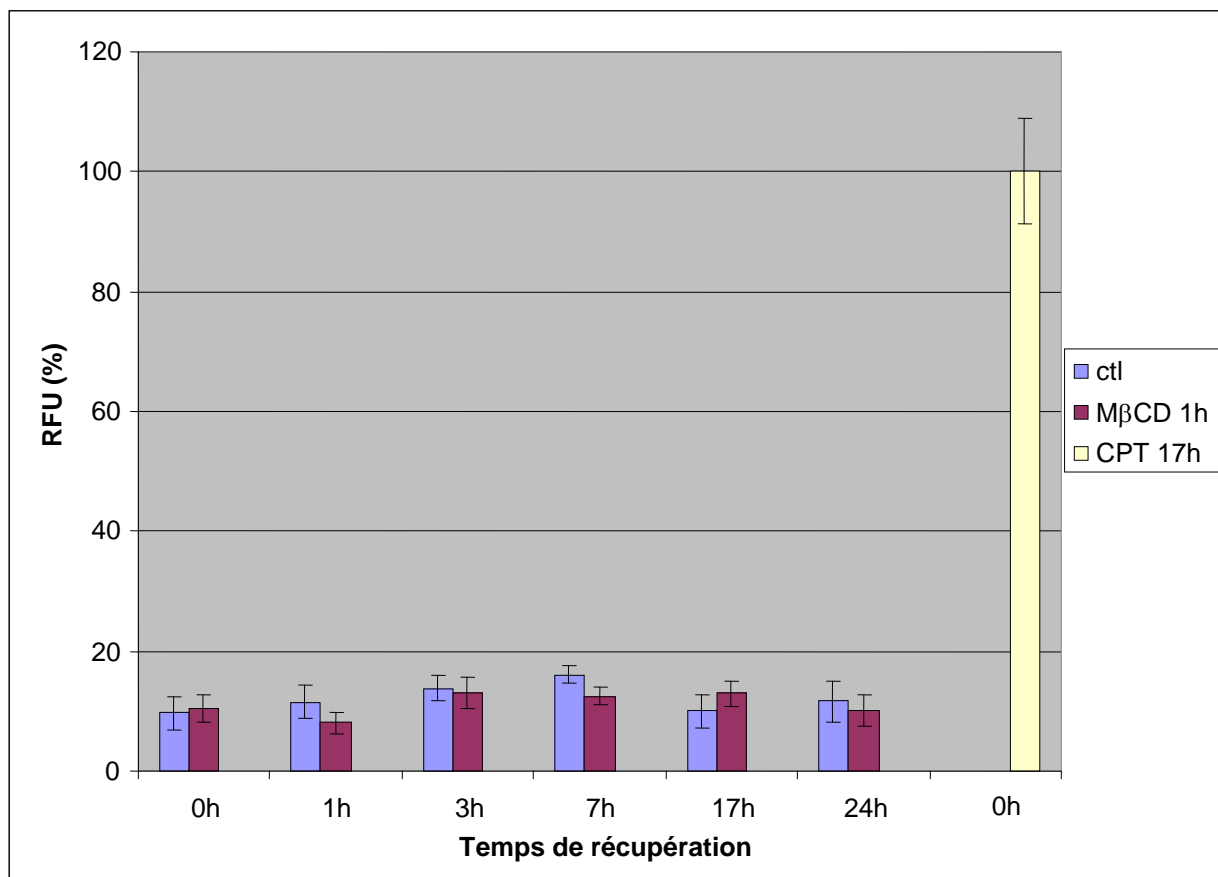


Figure 24 : Mesure de l'activité de la caspase-3. Les cellules ont été traitées pendant une heure avec 7,5 mM suivie d'une période de récupération aux temps indiqués, ou traitées pendant 17h avec 15 μ M de camptothécine. L'activité de la caspase-3 des lysats cellulaires a été mesurée avec un spectrofluorimètre. La mesure de l'échantillon traité avec la camptothécine a arbitrairement été fixée à 100%.

apoptotique de la M β CD sur les kératinocytes normaux. A l'inverse, les cellules ayant subi un traitement de 17h avec de la camptothecine montrent un niveau d'activité de la caspase-3 nettement plus important (augmentation d'environ 85-90%) par rapport aux autres échantillons, ce qui prouve que les conditions d'analyse de l'activité de la caspase-3 sont adaptées.

Ces observations montrent que la M β CD induit pas l'activation de la caspase-3, et suggèrent que l'apoptose ne serait pas activée dans ces conditions, sauf si elle passe par une autre voie n'impliquant pas la caspase-3.

[DISCUSSION]

Discussion et perspectives

I. Mort cellulaire

1. L'apoptose

Les *lipid rafts* sont des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides, et agissent comme plateformes de signalisation (Simons and Toomre, 2000). La M β CD est connue pour désorganiser les *lipid rafts* en séquestrant le cholestérol de la membrane plasmique (Klein *et al*, 1995). Dans les kératinocytes épidermiques humains, cette désorganisation induit l'activation du récepteur de l'EGF ainsi que de p38 MAPK (parfois considérée comme un inducteur de l'apoptose), menant à l'expression de marqueurs de différenciation comme l'involucrine (Jans *et al*, 2004) ou du facteur de croissance HB-EGF, impliqué dans la cicatrisation (Mathay *et al*, 2008). De plus, la désorganisation des *lipid rafts* mène à la déphosphorylation de la kinase anti-apoptotique Akt (Lambert *et al*, 2008), qui est impliquée dans la croissance cellulaire, le cycle cellulaire, et l'inhibition de l'apoptose (Sale et Sale, 2008). Bien qu'il ait été montré que la désorganisation des *lipid rafts* par le biais de l'utilisation de la M β CD entraînait des processus apoptotiques dans les cellules HaCaT via l'activation du récepteur de mort Fas (Bang *et al*, 2005), de l'activation de la caspase-8 et de la libération du cytochrome c (Schönfelder *et al*, 2006) ou de l'activation des caspases -3 et -7 (Calay *et al*, 2010), il semblerait qu'il n'en soit pas de même dans les kératinocytes épidermiques humains normaux. En effet, les cellules HaCaT sont des kératinocytes épidermiques humains qui sont devenus spontanément immortels, et paraissent plus sensibles à l'apoptose que les kératinocytes normaux. L'absence de l'activation de la caspase-3 après une heure de traitement à la M β CD dans nos cellules semble confirmer cette observation. Mais, pour s'assurer de l'absence d'activation de l'apoptose dans les kératinocytes normaux, il faudrait analyser si d'autres marqueurs apoptotiques comme les caspases -8 et -9 ou Bad/Bcl-xL sont activés, si le cytochrome c est libéré des mitochondries, ou si PPAR est clivé suite à la désorganisation des *lipid rafts*.

De plus, la M β CD semble avoir des effets différents sur l'apoptose en fonction des types cellulaires, puisque Gajate *et al* (2009) ont montré que l'apoptose induite dans des cellules T leucémiques pouvait être stoppée avec un traitement de 2,5 mg/ml de M β CD pendant 30 minutes, ceci par l'intermédiaire de l'inhibition des caspases -8, -10 et -9. Ce phénomène a été expliqué par le fait que les *lipid rafts* pourraient servir à recruter l'apoptosome et le *death inducing signaling complex* (DISC), formé par la caspase-8, entre autres. Ils ont aussi observé une diminution de la quantité de cholestérol total supérieure à 68%, ce qui est en accord avec nos résultats (Figure 15).

2. L'autophagie

Par ailleurs, Jans *et al* (2004) ont montré qu'il y avait une diminution de l'expression des kératines 14 et 10 et une augmentation de l'expression de l'involucrine par les kératinocytes, après traitement avec la M β CD. Or, ces kératines sont exprimées par les couches basales et suprabasales de l'épiderme, les cellules étant dans un état pas ou peu différencié ; et l'involucrine étant considérée comme un marqueur de différenciation car elle est exprimée dans les couches supérieures de l'épiderme, où les cellules présentent un phénotype différencié. Ceci suggère que la déplétion du cholestérol membranaire par la

M β CD pousse les cellules vers un état de différenciation. Or, on sait que la différenciation des kératinocytes mène à une mort cellulaire pour former la couche cornée.

De plus, une étude réalisée en 2009 par Gosselin *et al* montre que les kératinocytes sénescents n'expriment pas de marqueurs d'apoptose, mais qu'il y a des modifications au niveau de protéines impliquées dans l'autophagie, ce qui implique que ces cellules pourraient utiliser l'autophagie comme mort cellulaire, plutôt qu'une forme d'apoptose comme il est généralement suggéré dans la littérature.

Aussi, Akt est impliquée dans la régulation de l'autophagie. Ainsi, lorsqu'Akt est désactivée, elle ne permet pas l'activation de mTOR qui se trouve inhibée par les protéines TSC1 et 2, et l'autophagie n'est plus inhibée. Il est donc possible que le traitement à la M β CD favorise l'autophagie et la différenciation des kératinocytes par la déphosphorylation d'Akt dans ces cellules. Malheureusement, les analyses par Western-blot des phosphorylations de mTOR ne sont pas assez concluantes pour répondre à cette question.

II. Récupération

Comme la déphosphorylation d'Akt est réversible lorsqu'on laisse les cellules récupérer dans du milieu normal, nous avons étudié le rôle du cholestérol dans cette récupération. Nous avons inhibé la voie de synthèse du cholestérol avec de la lovastatine et nous avons pu constater qu'en présence de lovastatine, les cellules n'étaient pas capables de rephosphoryler Akt à un niveau basal, tandis que la phosphorylation du récepteur de l'EGF disparaît (Figure 14), que la quantité de cholestérol total reste inférieure de moitié au niveau normal (Figure 15) et que les *lipid rafts* visualisés avec la sous-unité B de la toxine du choléra n'étaient pas reformés (Figure 13C). Ceci montre qu'après traitement, les cellules peuvent resynthétiser le cholestérol, ce qui leur permet de réorganiser les *lipid rafts* et de retrouver un état « normal ». L'inhibition avec la lovastatine indique que le cholestérol ou un de ses précurseurs est indispensable à cette réorganisation cellulaire.

De plus, Lambert *et al* (2008) avaient déjà démontré cette capacité de récupération, car ils avaient montré que suite à un traitement d'une heure avec la M β CD, le récepteur est internalisé après 1 à 3 heures, lorsqu'on laisse les cellules récupérer dans du milieu normal, et que cette internalisation est suivie de la dégradation du récepteur par le protéasome après 3 heures de récupération. Après 7 heures de récupération, ils avaient observé un retour en membrane du récepteur, et une diminution de l'activité de p38. Or, on peut remarquer que la phosphorylation d'Akt est retrouvée après une période de récupération de 7h, correspondant au retour en membrane du récepteur de l'EGF. Ceci nous laisse donc supposer que les cellules nécessitent 7 heures de récupération afin de retrouver leur état d'homéostasie.

III. Mécanismes de la M β CD

1. La PI3K

Par la suite, nous avons cherché à comprendre quels mécanismes sont activés par la déplétion en cholestérol des cellules. Comme les activations de PDK1 et de mTOR ne semblent pas modifiées par le traitement avec la M β CD et que le récepteur de l'EGF est activé dans ces conditions (Figure 12), nous avons supposé que la déphosphorylation d'Akt

était due à son impossibilité d'être recrutée en membrane, soit à une inactivation de la PI3K et/ou une absence du PIP₃ dans la membrane plasmique.

Les inhibitions de la PI3K par la wortmannine et le LY294002 semblent montrer que la MβCD pourrait agir en inhibant la PI3K (Figures 17 et 18). Ainsi, nous avons voulu savoir de quelle façon la MβCD inhibait cette enzyme. Nous avons donc co-immunoprécipité la sous-unité p85 de la PI3K avec le récepteur de l'EGF (Figure 19), et nous avons pu constater qu'il ne semblait pas y avoir de co-immunoprécipitation dans nos conditions. Mais, le résultat négatif de notre technique ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas d'interaction entre le récepteur de l'EGF et p85, puisque p85 peut interagir avec le récepteur ErbB3 (Jorissen *et al*, 2003), qui ne sera pas reconnu par l'anticorps précipitant LA1. Finalement, notre observation ne permet pas de savoir si la PI3K est inhibée après le traitement avec la MβCD.

Toutefois, Calay *et al* (2010), qui ont travaillé sur les cellules HaCaT, ont montré qu'il y avait une interaction entre p85 et le récepteur de l'EGF et ont réussi à les co-immunoprécipiter, dans les échantillons contrôles comme dans les échantillons traités avec la MβCD pendant des temps compris entre 5 minutes et une heure. De plus, ils ont montré également que la PI3K ne voyait pas son activité modifiée par les traitements avec la MβCD. Mais, ces essais ont été réalisés sur des cellules HaCaT devenues spontanément immortelles, et il est possible que le récepteur de l'EGF soit plus activé dans ces cellules, favorisant le recrutement de la PI3K par le récepteur. En effet, aucune analyse de l'activation du récepteur n'a été effectuée dans cette étude.

Par ailleurs, le marquage en immunofluorescence de p85 ne montre pas une localisation en membrane de p85, mais dans le cytoplasme (Figure 18). Cette absence de présence en membrane peut être expliquée par le fait qu'une partie du récepteur de l'EGF est toujours activée, car les cellules produisent elles-mêmes des facteurs de croissance. Après son activation, le récepteur de l'EGF est invaginé à l'intérieur des cellules, emportant avec lui une portion de la membrane plasmique et ce qu'elle contient (Lambert *et al*, 2008). On peut donc facilement imaginer que du PIP₂ puisse se retrouver sur ces endosomes, et que la PI3K soit donc activée à l'intérieur du cytoplasme, au contact de la membrane des endosomes. Puis elle va phosphoryler le PIP₂ en PIP₃ qui va recruter Akt et PDK1. Ainsi, le processus que l'on connaît pour avoir lieu au niveau de la membrane plasmique pourrait aussi se passer dans le cytoplasme, d'autant plus que le marquage d'Akt activé sur chacun de ses sites de phosphorylation montre qu'Akt est également présent dans le cytoplasme (Figure 20).

Afin de déterminer si la PI3K interagit directement avec EGFR, il faudrait s'intéresser à la phosphorylation de la tyrosine 920 du récepteur enfin de connaître les circonstances dans lesquelles le récepteur est capable d'interagir avec la PI3K. Malheureusement, aucun anticorps dirigé contre cette tyrosine n'a été trouvé dans le commerce. Une autre possibilité est l'analyse par spectrométrie de masse. Nous aurions également pu immunoprécipiter ErbB3 afin de vérifier s'il recrutait la PI3K, mais il aurait fallu avoir le matériel et le temps nécessaire.

2. PTEN

PTEN est une enzyme qui joue le rôle inverse de la PI3K, puisqu'elle déphosphoryle le PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂. Comme nous n'avons pas réussi à déterminer si la PI3K est inhibée suite à l'action de la MβCD sur le cholestérol membranaire, nous avons tenté

d'identifier si l'activité de PTEN était augmentée après le traitement à la M β CD, avec l'inhibiteur de PTEN bpV (pic). Bien que nous ayons montré que notre inhibiteur agissait bien sur PTEN, l'absence de phosphorylation d'Akt sur la sérine 473 et la thréonine 308 après le traitement pendant une heure avec 7,5 mM de M β CD et en présence de 5 μ M de bpV (pic) montre qu'inhiber PTEN ne permet pas de conserver l'état d'activation d'Akt, ce qui semble indiquer que cette phosphatase n'est pas impliquée dans la déphosphorylation d'Akt après la déplétion en cholestérol.

3. PDK1

Une autre hypothèse, émise par Calay *et al* (2010), provient de PDK1 et sa translocation dans le noyau, qui se fait dépendamment de la voie de la PI3K (Lim *et al*, 2003). En effet, après traitement à la M β CD, Calay *et al* retrouvent PDK1 dans le noyau, et perdent le marquage dans le cytoplasme, ce qui pourrait expliquer l'absence de phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 suite au traitement. Néanmoins, comme cette translocation vers le noyau est PI3K-dépendante, il est difficile d'imaginer qu'elle puisse avoir lieu avant que PDK1 n'ait le temps de phosphoryler Akt pendant un traitement à la M β CD, d'autant plus que dans des conditions normales, la PI3K fonctionne et Akt est phosphorylée, et PDK1 n'est pas transloquée dans le noyau (Calay *et al*, 2010).

4. Akt

Akt est connue pour être phosphorylée à la membrane plasmique des cellules, puis transloquée dans le noyau où la protéine agit sur des facteurs de transcription, pour les activer ou au contraire les inhiber (Ananthanarayanan *et al*, 2005). Jans *et al* (2004) ont montré que la déplétion en cholestérol par l'intermédiaire de la M β CD diminuait l'expression de la kératine 10 par les kératinocytes. Or, cette kératine est connue pour avoir la capacité de se lier avec Akt et l'empêcher d'être transloquée dans le noyau (Paramio *et al*, 2001). Ainsi, par immunofluorescence, nous avons obtenu un marquage cytoplasmique pour les formes phosphorylées d'Akt après le traitement à la M β CD (Figure 21). Ce marquage nucléaire peut donc s'expliquer par la diminution de kératines 10 dans les cellules, favorisant ainsi la translocation d'Akt dans le noyau. Aussi, du fait que le recrutement en membrane d'Akt, et par conséquent ses phosphorylations sont bloquées suite à la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique, mais que des formes phosphorylées sont toujours présentes dans le noyau après le traitement par la M β CD, nous pouvons supposer qu'Akt est régulée de façon cyclique dans les kératinocytes.

IV. Les lipid rafts

Enfin, nous avons voulu en savoir plus sur les *lipid rafts* et les protéines qu'ils contiennent. A l'aide de gradients de densité de saccharose, nous avons essayé de les isoler mais seul un « profil de localisation » est ressorti de cet essai, qui nous suggère qu'Akt et le récepteur de l'EGF pourraient se situer dans les mêmes fractions membranaires (Figure 22).

Dans l'étude réalisée par Calay *et al* (2010), ils ont réussi à isoler les *lipid rafts* dans les fractions 3 et 4, sur 8 fractions au total. Bien que nous ayons trouvé nos marqueurs des *lipid rafts* dans la même partie du gradient (au « centre » de celui-ci), nous avons ajouté une

couche de 21% de saccharose, et nos *lipid rafts* semblent se trouver à l'interface des couches à 35% et 21%. L'équipe de Calay n'ayant effectué que trois densités de saccharose (40%, 30% et 5%), il semblerait donc qu'ils retrouvent les *lipid rafts* dans les fractions correspondant à la densité de 30% de saccharose, ce qui est concordant avec nos propres résultats.

Le(s) rôle(s) des *lipid rafts* est (sont) encore peu connu(s). Néanmoins, une étude a montré, grâce à la technique de FRET (*fluorescence resonance energy transfert*), qu'après un traitement de 30 minutes avec 5 mM de M β CD, l'activité d'Akt était diminuée de 20% voire abolie en fonction du facteur de croissance utilisé pour stimuler les cellules (Gao et Zhang, 2008), ce qui est en concordance avec nos résultats permettant d'affirmer que l'intégrité des *lipid rafts* est indispensable à l'activation d'Akt. Suite à cela, ils ont créé deux sondes, l'une pouvant se fixer dans les *lipid rafts*, l'autre se fixant dans les autres régions de la membrane, afin de comparer l'activité d'Akt. Et, lorsqu'ils stimulent les cellules avec du PDGF, seule l'activité d'Akt située dans les *lipid rafts* diminue après le traitement avec la M β CD, tandis que lorsque les cellules sont stimulées avec de l'IGF-1, l'activité d'Akt est fortement diminuée tant dans les *lipid rafts* que dans les autres régions de la membrane plasmique. De plus, ils ont montré qu'Akt dans les *lipid rafts* était activée plus rapidement que lorsque cette protéine est située à l'extérieure des *lipid rafts*, certainement dû au fait que les *lipid rafts* contiennent également les récepteurs, la PI3K etc.

V. Conclusions et perspectives

Pour conclure, notre grande hypothèse est que la déplétion du cholestérol causée par la M β CD mène à la désorganisation des *lipid rafts*. Ceux-ci n'existant plus sous leur forme habituelle, le récepteur de l'EGF ne pourrait plus recruter la sous-unité p85 de la PI3K, empêchant son activation, le PIP₃ ne serait plus formé, et/ou ne serait plus présent en membrane à cause de la désorganisation des *lipid rafts*, et/ou PTEN ou SHIP1 et 2 (qui déphosphorylent le PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂) seraient suractivées, et/ou ni Akt, ni PDK1 ne pourraient être recrutées en membrane, bloquant l'activation d'Akt. Néanmoins, ceci reste des hypothèses, qu'on ne peut encore confirmer ou rejeter.

Si ce sujet pouvait être poursuivi, il serait intéressant de comprendre comment fonctionne la PI3K dans les kératinocytes. En effet, les cellules au repos présentent un récepteur de l'EGF qui ne semble pas activé, tandis qu'Akt est phosphorylée sur ses deux sites de phosphorylation. Or, pour être activée, Akt doit être recrutée en membrane par le PIP₃, lui-même formé par la PI3K. Mais le récepteur de l'EGF n'étant pas activé, comment le PIP₃ peut-il être en membrane ? Il faudrait donc vérifier l'activation de la PI3K et analyser si un autre récepteur à activité tyrosine kinase est impliqué dans cette activation. Aussi, il serait enrichissant d'explorer encore les *lipid rafts* et de réussir à déterminer quelles protéines y sont réellement présentes, ainsi que le PIP₂ et PIP₃, et si ces protéines/lipides subissent une relocalisation après le traitement à la M β CD. Une autre piste à étudier est si PTEN, à défaut d'être suractivée, est surexprimée après le traitement, hypothèse pouvant expliquer la déphosphorylation d'Akt.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P. (2008) Molecular Biology of the Cell (cinquième édition). *Garland Science*, New-York, 1268 p.
- Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R. J., Reese C. B. et Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol.* 7:261–269
- Aman M. J., Lamkin T. D., Okadaï H., Kurosakii T. et Ravichandran K. S. (1998) The Inositol Phosphatase SHIP Inhibits Akt/PKB Activation in B Cells. *J. Biol. Chem.* 273:33922–33928
- Ananthanarayanan B., Ni Q. Et Zhang J. (2005) Signal propagation from membrane messengers to nuclear effectors revealed by reporters of phosphoinositide dynamics and Akt activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15081–15086
- Bang B., Gniadecki R. et Gajkowska B. (2005) Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 14:266–272
- Biggs W. H. III, Meisenhelder J., Hunter T., Cavenee W. K. et Arden K. C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7421–7426
- Bright J. J. et Khar A. (1994) Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci. Rep.* 14:67–81
- Brognaïrd J., Sieracki E., Gao T. et Newton A. C. (2007) PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol. Cell* 25:917–931
- Brunn G. J., Hudson C. C., Sekulic' A., Williams J. M., Hosoi H., Houghton P. J., Lawrence J. C. Jr. et Abraham R. T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277:99–101
- Calay D., Vind-Kezunovic D., Frankart A., Lambert S., Poumay Y. Et Gniadecki R. (2010) Inhibition of Akt signalling by exclusion of lipid rafts in normal and transformed epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* Sous presse
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. et Reed J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318–1321
- Choi Y., Zhang J., Murga C., Yu H., Koller E., Monia B. P., Gutkind J. S. et Li W. (2002) PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene* 21:5289 – 5300
- Conus S., Simon H. U. (2008) Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory Responses. *Biochem. Pharmacol.* 76:1374–1382
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H, Gotoh Y. et Greenberg M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231–241
- Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Gene & Dev.* 13:2905–2927
- De Potter I. Y., Poumay Y., Squillace K. A. et Pittelkow M. R. (2001) Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp. Cell Res.* 271:315–328

- Del Peso L., González-García M., Page C., Herrera R. et Nuñez G. (1997) Interleukin-3–induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689
- Djordjevic S. et Driscoll P. C. (2002) Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *TRENDS Biochem. Sci.* 27:426-432
- Du K. et Montminy M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273:32377-32379
- Du K., Herzig S., Kulkarni R. N. et Montminy M. (2003) TRB3: A *tribbles* homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300:1574-1577
- Duronio V. (2008) The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.* 415:333-344
- Efimova T., Broome A. M., Eckert R. L. (2003) A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J. Biol. Chem.* 278:34277-34285
- Gajate C., Gonzalez-Camacho F. et Mollinedo F. (2009) Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380:780-784
- Gandarillas A., Goldsmith L. A., Gschmeissner S., Leigh I. M. et Watt F. M. (1999) Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp. Dermatol.* 8:71–79
- Gao T., Furnari F. et Newton A. C. (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18:13–24
- Gao X. et Zhang J. (2008) Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains. *Mol. Biol. Cell* 19:4366–4373
- Georgescu M.-M., Kirsh K. H., Akagi T., Shishido T. et Hanafusa H. (1999) The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10182-10187
- Gniadecki R., Christoffersen N. et Wulf H. C. (2002) Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* 118:582-588
- Gniadecki R. et Bang B. (2003) Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121:522-528
- Gniadecki R. (2004) Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:165-169
- Golub T., Wacha S. et Caroni P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:542–550
- Gosselin K., Deruy E., Martien S., Vercamer C., Bouali F., Dujardin T., Slomianny C., Houel-Renault L., Chelli F., De Launoit Y. et Abbadie C. (2009) Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am. J. Pathol.* 174:423-435
- Haake A., Glynis S. A. et Holbrook K. A. (2001) Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis (chapître 2), in *The Biology of the Skin*, édité par Freinkel R. K. and Woodley D. T., *Parthenon Publishing*, New-York pps 19-44
- Inoue A., Yamazaki M. et Ogawa H. (2004) Epidermal growth factor activates m-calpain, resulting in apoptosis of HaCaT keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 36:60-62

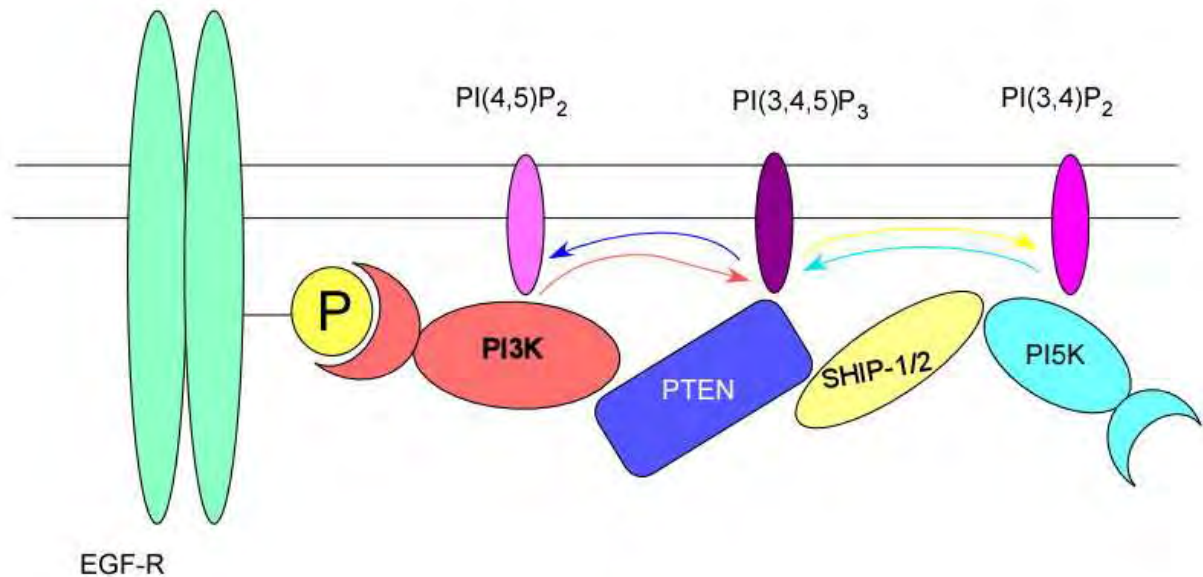
- Jahn T., Leifheit E., Gooch S., Sindhu S. et Weinberg K. (2007) Lipid rafts are required for Kit survival and proliferation signals. *Blood* 110:1739-1747
- Jans R., Atanasova G., Jadot M. et Poumay Y. (2004) Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J. Invest. Dermatol.* 123:564-573
- Jorissen R. N., Walker F., Pouliot N., Garret T. P. J., Ward C. W. et Burgess A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* 284:31-53
- Kane L. P., Shapiro V. S., Stokoe D. et Weiss A. (1999) Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 9:601-604
- Kennedy S. G., Wagner A. J., Conzen S. D., Jordan J., Bellacosa A., Tsichlis P. N. et Hay N. (1997) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11:701-713
- Klein U., Gimpl G. et Fahrenholz F. (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34:13784-13793
- Krishna M. et Narang H. (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:3525-3544
- Kuo Y. C., Huang K. Y., Yang C. H., Yang Y. S., Lee W. Y. et Chiang C. W. (2008) Regulation of phosphorylation of thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* 283:1882-1892
- Kwang W. J. (1999) International review of cytology: A survey in cell biology. *Academic Press*, vol. 188, 308 p.
- Lambert S., Vind-Kezunovic D., Karvinen S. et Gniadecki R. (2006) Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J. Invest. Dermatol.* 126:954-962
- Lambert S., Ameels H., Gniadecki R., Hérin M. et Poumay Y. (2008) Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation. *J. Cell. Physiol.* 217:834-845
- Lambert S., Gniadecki R. et Poumay Y. (2009) Cholesterol and lipid rafts as regulators of signaling through the EGF receptor in keratinocytes. *The Open Dermatology Journal* 3:151-158
- Lambert S. (2009) Etude du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques en réponse au stress induit par la méthyl-B-cyclodextrine. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur, faculté de Médecine.
- Lim M. A., Kikani C. K., Wick M. J. et Dong L. Q. (2003) Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): A potential regulatory mechanism for PDK-1 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14006-14011
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Maira S. M., Galetic I., Brazil D. P., Kaech S., Ingley E., Thelen M. et Hemmings B. A. (2001) Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* 294:374-380
- Mathay C., Giltaire S., Minner F., Bera E., Hérin M. et Poumay Y. (2008) Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.* 128:717-727

- Minner F., Herphelin F. et Poumay Y. (2009) Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol. Biol.* 585:71-82
- Paramio J. M., Segrelles C., Ruiz S. et Jorcano J. L. (2001) Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC ζ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell Biol.* 21:7449-7459
- Pece S., Chiariello M., Murga C. et Gutkind J. S. (1999) Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 274:19347-19351
- Pike L. J. (2005) Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim. Biophys. Acta* 1746:260-273
- Poumay Y. et Pittelkow M. R. (1995) Cell density and culture factors regulate kératinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* 104:271-276
- Poumay Y., Herphelin F., Smits P., De Potter I. Y. et Pittelkow M. R. (1999) High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2:138-144
- Raj D., Brash D. E. et Grossman D. (2006) Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J. Invest. Dermatol.* 126:243-257
- Rena G., Guo S., Cichy S. C., Unterman T. G. et Cohen P. (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 274:17179-17183
- Rendl M., Ban J., Mrass P., Mayer C., Lengauer B., Eckhart L., Declerq W. et Tschachler E. (2002) Caspase-14 expression by epidermal keratinocytes is regulated by retinoids in a differentiation-associated manner. *J. Invest. Dermatol.* 119:1150-1155
- Sale E. M. et Sale G. J. (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:113-127
- Samuels Y., Wang Z., Bardelli A., Silliman N., Ptak J., Szabo S., Yan H., Gazdar A., Powell S. M., Riggins G. J., Willson J. K. V., Markowitz S., Kinzler K. W., Vogelstein B. et Velculescu V. E. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304:554
- Scheid M. P., Huber M., Damen J. E., Hughes M., Kang V., Neilsen P., Prestwich G. D., Krystal G. et Duronio V. (2002) Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P₂ is required for PKB phosphorylation at Ser-473. *J. Biol. Chem.* 277:9027-9035
- Schmid A. C., Byrne R. D., Vilar R. et Woscholski R. (2004) Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Lett.* 566:35-38
- Schmidt R., Parish E. J., Dionisius V., Cathelineau C., Michel S., Shroot B., Rolland A., Brzokewicz A. et Reichert U. (1991) Modulation of cellular cholesterol and its effect on cornified envelope formation in cultured human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 97:771-775
- Schönfelder U., Radestock A., Elsner P. et Hipler U.-C. (2006) Cyclodextrin-induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. *Exp. Dermatol.* 15:883-890
- Simons K. et Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572

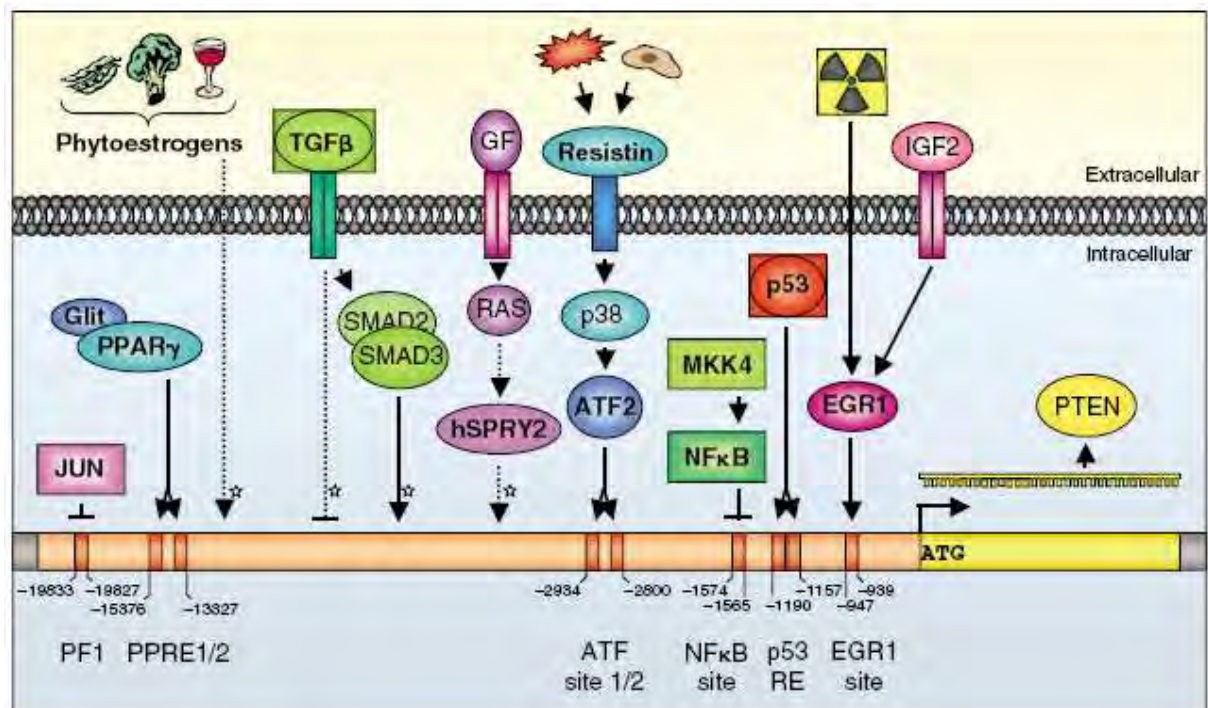
- Simons K. et Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1 :31-39
- Tamguney T. et Stokoe D. (2007) New insights into PTEN. *J. Cell Sci.* 120:4071-4079
- Wymann M. P., Bulgarelli-Leva G., Zvebelil M. J., Pirola L., Vanhaesebroeck B., Waterfield M. D. et Panayotou G. (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modifications of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.* 16:1722-1733
- Yang Q. et Guan K.-L. (2007) Expanding mTOR signaling. *Cell Res.* 17:666-681
- Yarden Y. et Schlessinger J. (1987) Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 26:1434-1442
- Zakeri Z. et Lockshin R. A. (2002) Cell death during development. *J. Immunol. Methods* 265:3-20

ANNEXES

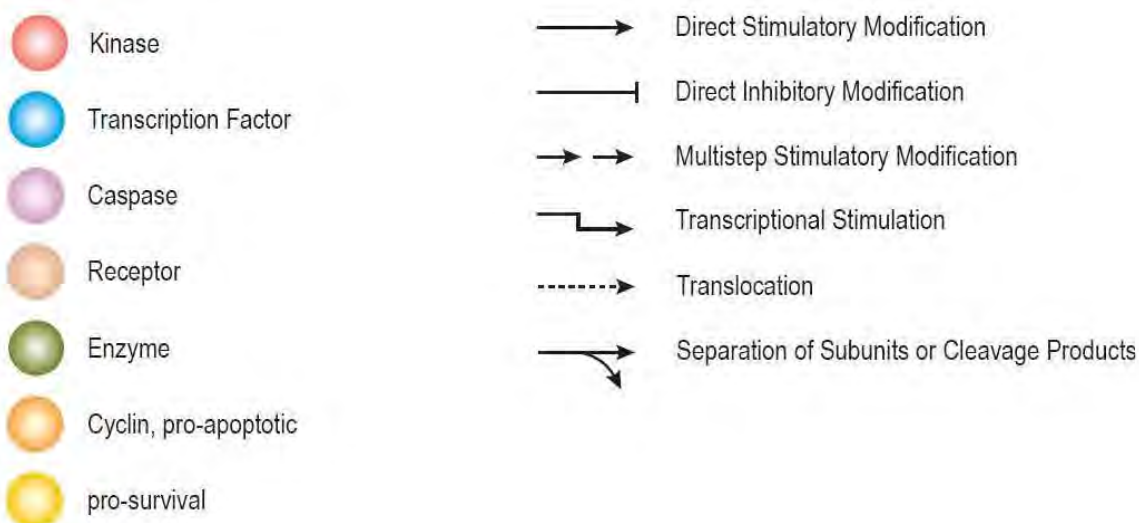
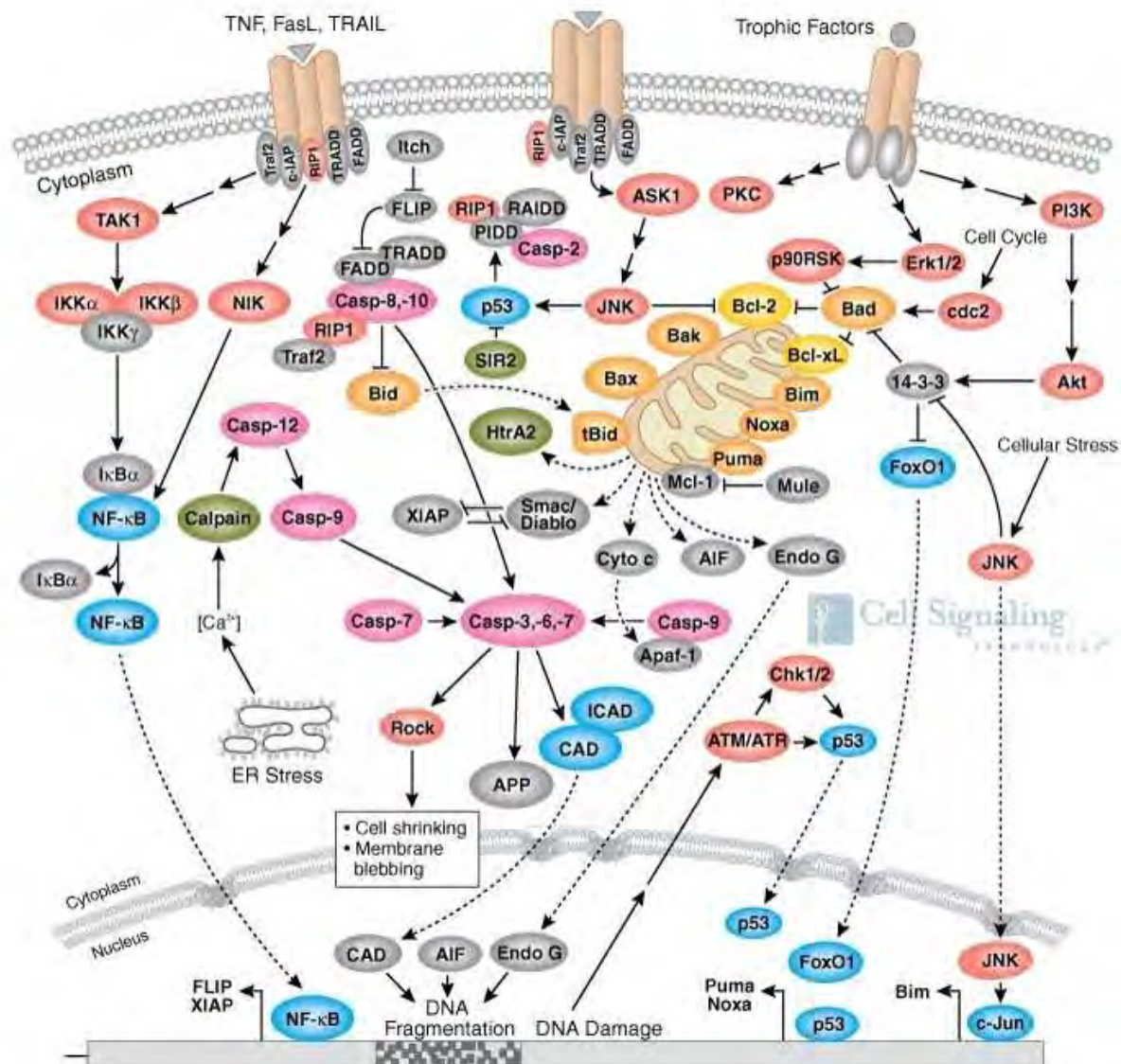
Annexes



Annexe 1 : Régulation du PI(3,4,5)P₃.



Annexe 2 : Facteurs régulant la transcription de PTEN. Les étoiles signifient que les voies concernées ne possèdent pas de sites spécifiques sur le promoteur de PTEN. (Tamguney et Stokoe, 2007)



Annexe 3 : Description des voies apoptotiques.

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Apoptosis_Overview.html